

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

تأثیر محیط‌های رشد و منبع آهن در ریزازدیادی و ریشه‌زایی پایه‌های نیمه پاکوتاه‌کننده گلابی پیروودوارف  
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<sup>۱</sup>، حمید عبداللهی<sup>۲</sup>، آزاده معینی<sup>۳</sup> و اسماعیل روح‌الامین<sup>۴</sup>

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. تأثیر محیط‌های رشد و منبع آهن در ریزازدیادی و ریشه‌زایی پایه‌های نیمه پاکوتاه‌کننده گلابی پیروودوارف 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 پاکوتاه‌کننده گلابی پیروودوارف (Pyrodwarf) و OH×F87 و بررسی اثر محیط‌های کشت و منبع آهن و روش ریشه‌زایی این پایه‌ها انجام شد. ارزیابی اثر پنج نوع محیط پایه شامل MS، MS تغییر یافته، DKW، QL و QL تغییر یافته، 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 تکروز انجام و بیش‌ترین میزان پرآوری برای پایه پیروودوارف 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 تنظیم‌کننده رشد IBA استفاده شد. نتایج بیانگر ریشه‌زایی کامل در تمامی شاخه‌چه‌ها بود، 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.

## 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 (*Crataegus* 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 در بردارنده 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

تاثیر محیط‌های رشد و منبع آهن در ریزازدیادی و ریشه‌زایی پایه‌های...

(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 میلی گرم 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 نترات 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

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 تجاری پیروودوارف (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

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 تغییر یافته (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 تغییر یافته بودند. کلیه محیط‌های مورد استفاده با ۱ میلی گرم بر لیتر سایتوکینین BAP و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر NAA همراه با ۳ درصد ساکاروز، ۵/۵ گرم بر لیتر آگار (Merck, Germany) و ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر میواینوزیتول غنی شده (Khodaei Chegenee et al., 2011) و pH ۵/۷ کلیه محیط‌ها قبل از افزودن آگار روی ۵/۷ تنظیم شده بود. هر شیشه کشت با حجم ۲۰۰ میلی لیتری، حاوی ۳۰ تا ۳۵ میلی لیتر محیط

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 منیزیم (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 پیروودوارف 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 پیروودوارف 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 پیروودوارف و OH×F87 برنامه‌ریزی و انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده شامل دو پایه نیمه پاکوتاه کننده پیروودوارف (Rhenus 1®) و

مد نظر واقع نشد.

#### ارزیابی توان ریشه‌زایی

شاخه‌چه‌های 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 و MS 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 شاخه‌چه‌های مورد استفاده برای ریشه‌زایی به مدت چهار هفته در محیط حاوی تنظیم کننده‌های 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

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 میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و دمای شبانه‌روزی  $24 \pm 1$  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 مطلوب تر 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 تشکیل دهنده 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 این جا

محیط کشت درون شیشه‌ای از نظر میزان رشد و شادابی تفاوت قابل توجهی داشتند. به طور کلی واکنش پایه پیروودوارف 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 پیروودوارف 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 تغییر یافته، DKW، QL و QL تغییر یافته گذشته بود، حاکی از تفاوت معنی‌دار در مقایسات میانگین صفات میزان پرآوری، طول شاخه‌چه‌های درون شیشه و شاخص توسعه سطح برگ آن‌ها بود. میزان نکرور 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 پیروودوارف در محیط QL تغییر یافته به میزان ۳/۳ شاخه‌چه به ازاء ریزنمونه و برای پایه OH×F87 در محیط QL به میزان ۵/۳ شاخه‌چه به ازاء ریزنمونه مشاهده شد و پس از آن محیط‌های MS، DKW و MS تغییر یافته در

گرفته شد. آزمایش اول در پنج تکرار و حداقل پنج شاخه‌چه در هر شیشه انجام شد، ولی به منظور دستیابی به تعداد شاخه‌چه 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 عدد از هر پایه، به محیط‌های 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 پیروودوارف و OH×F87 در شرایط

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

Table 1. Mean comparison of various vegetative characteristics of two *in vitro* pear rootstock on different culture media

Media	تعداد شاخه Proliferation		طول شاخه‌چه Shoot length (mm)		توسعه سطح برگ Leaf expansion (mm <sup>2</sup> )		نکروز Necrosis (%)	
	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.

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 پیروودوارف در محیط QL تغییر یافته و برای پایه OH×F87 در محیط‌های QL تغییر یافته، MS و MS تغییر یافته مشاهده شد (جدول ۱). این داده در درجه اول بیانگر حساسیت کم‌تر پایه OH×F87 نسبت به پایه پیروودوارف نسبت به تغییرات میزان یون‌ها در محیط کشت بوده، ثانیاً افزایش میزان

رتبه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۱). مقایسه میزان نسبت یون‌های آمونیوم به نترات و همچنین جایگزینی نمک کلرور کلسیم با نترات 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)، دیائولی و همکاران (۱۹۹۴)، خدائی چگنی و همکاران (۲۰۱۱) و عبداللهی و همکاران (۲۰۰۵) که محیط‌های کشت مبتنی بر نمک‌های معدنی QL نتایج بهتری از محیط‌های 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



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 پیروودوارف 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 تعداد ۳/۵ 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 پایه OH×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 پیروودوارف در هفته هشتم به ۸/۵ سانتی‌متر بالغ شد (جدول ۳). با توجه به این که در برخی

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 این جا 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 پیروودوارف و OH×F87 در شرایط درون شیشه است. این نتایج با گزارش‌های استیمارت و هارباگ (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 پایه‌هایی که به صورت رویشی



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

Source of Fe	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	
	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

Source of Fe	طول شاخه‌چه در هفته چهارم Shoot length in week 4 (cm)		طول شاخه‌چه در هفته ششم Shoot length in week 6 (cm)		طول شاخه‌چه در هفته هشتم Shoot length in week 8 (cm)	
	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.

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 ریشه‌زایی در ریزقلمه‌های هر دو پایه مورد آزمایش مشاهده شد. ریشه‌زایی به جز در شاخه‌چه پایه پیروودارف مستقر شده در محیط فاقد IBA، در سایر شاخه‌چه‌ها حتی روی محیط فاقد IBA تقریباً به صورت کامل دیده شد (جدول ۴). به نظر می‌رسد این میزان ریشه‌زایی بالا در مقایسه با دیگر گزارش‌های قبلی که حداکثر ۵۰ درصد در بررسی خدائی چگنی و

دستورالعمل‌های کشت بافتی استفاده از سه مرحله پرآوری، رشد طولی شاخه‌چه (Elongation) و سپس ریشه‌زایی به جای فرآیند دو مرحله‌ای پرآوری و ریشه‌زایی مورد توصیه است (DePaoli *et al.*, 1994) و با توجه به نقش مفید Fe-EDDHA در رشد طولی شاخه‌چه‌ها با کیفیت برتر برای استفاده در مرحله ریشه‌زایی، 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 ریشه‌زایی از

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)		تعداد ریشه (هفته ششم)		طول ریشه (هفته چهارم)		طول ریشه (هفته ششم)	
	Root number in week 4		Root number in week 6		Root length in week 4 (cm)		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.

از شش هفته روی محیط حاوی ۰/۵ میلی گرم بر لیتر IBA مشاهده شد (جدول ۴). میزان افزایش تعداد ریشه به ازاء شاخه چه در پایه پیرودارف بین چهار تا شش هفته چندان زیاد نبود، این در حالی 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 میلی گرم 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

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 سایتو کینین، 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 پیرودارف در چهار هفته روی محیط MS فاقد تنظیم کننده رشد و پس

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 نترات 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 پیروودوارف 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.

اغلب در محدوده ۱ تا ۲ سانتی‌متر در هر دو پایه پیروودوارف 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 تیمارهایی 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

## 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  $\text{NH}_4^+$ -N/ $\text{NO}_3^-$ -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 Breeding, 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 Horticulturae 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.
- Khodae 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. Physiologia 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<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 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.