ریزافزایی گلابی وحشی گونه‌ی *Pyrus syriaca*

Micropropagation of Wild Pear (*Pyrus syriaca*)

یوسف‌علی سعادت[۱*]، بدرالسادات موسوی[۲] و شیماالسادات بهشتی‌روی[۳]

تاریخ دریافت: ۲۱/۳/۹۱ تاریخ پذیرش: ۲/۱۰/۹۱

چکیده

استان فارس یکی از رویشگاه‌های طبیعی گلابی وحشی گونه‌ی *Pyrus syriaca* در ایران است. برداشت میوه، چرای بی‌رویه عرصه‌های جنگلی، تخریب جنگل‌ها و توسعه کشاورزی در سال‌های اخیر به شدت زادآوری طبیعی این گونه را مختل نموده است. این پژوهش به منظور دست‌یابی به روش سریع و آسان برای ازدیاد انبوه *P. syriaca* با استفاده از تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای انجام گردید. نوک شاخساره و قطعه‌های ساقه‌ی شاخه‌های رشد فصل جاری درختان انتخاب شده در جنگل ده‌کهنه سپیدان به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. استقرار کشت‌های بدون آلودگی بر روی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) دارای ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر اسید ایندول بوتیریک (IBA) صورت گرفت. میزان ۰/۸ تا ۱ میلی‌گرم در لیتر BA برای افزونش شاخساره بهینه تشخیص داده شد. ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای در دو مرحله انگیزش ریشه در شرایط درون شیشه‌ای و نمو ریشه‌ها در شرایط بیرون از شیشه بهترین روش بود. شاخساره‌های کشت شده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی بر روی محیط کشت ویژه گردوی درایور و کانی‌یوکی (DKW) با نصف غلظت عناصر ماکرو و دارای ۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، پس از انتقال به گلدان‌های جیفی صددرصد ریشه‌دار شدند. افزودن ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA به محیط کشت تاثیر منفی روی ریشه‌زایی داشت و در مقایسه با محیط کشت‌های بدون BA درصد ریشه‌زایی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: افزونش شاخساره، ریشه‌زایی، گلابی وحشی، محیط کشت DKW

۱. استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، شیراز

۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا

*: نویسنده مسوول **Email**: saadat@farsagres.ir

مقدمه

ایران با دارا بودن بیش از ده گونه گلابی یکی از مهم‌ترین مناطق گوناگونی ژنتیکی گونه‌های گلابی‌وحشی و از منابع مهم ژنتیکی این درخت ارزشمند در دنیا محسوب می‌گردد (*خاتم ساز*، ۱۳۷۱). *زمانی و همکاران* (Zamani *et al*. 2012) نیز به تازگی ۴ گونه جدید گلابی از ایران گزارش نموده‌اند. استان فارس دارای ۱۳۲۲۰۰۰ هکتار جنگل طبیعی بوده که به دلیل گوناگونی آب و هوایی در سرتاسر این استان پهناور به صورت جامعه‌های متنوع گیاهی و جنگلی ظاهر شده‌اند. گلابی‌وحشی از گونه‌های جنگلی استان فارس است که وسعت آن در شهرستان سپیدان ۳۰۰۰۰ هکتار گزارش شده است (*حمزه‌پور و بردبار*، ۱۳۷۸) و از نظر مسایل اکولوژیکی، تولید محصولات فرعی و ذخیره‌گاه ژنتیکی بی‌نظیر، دارای اهمیت ویژه می‌باشد. براساس مطالعه‌های انجام گرفته توسط *خاتم‌ساز* (۱۳۷۱) گونه *Pyrus syriaca* Boiss. با نام محلی هرمو یکی از گونه‌های گلابی وحشی بومی استان فارس است که در اطراف جاده سپیدان به سمت یاسوج در استان فارس رویش دارد.

باوجودی‌که استان فارس یکی از رویشگاه‌های طبیعی *P. syriaca* در ایران می‌باشد اطلاعات کافی در مورد جنبه‌های مختلف رشد این گونه وجود ندارد. برداشت میوه، چرای بی‌رویه عرصه‌های جنگلی و تبدیل اراضی به باغ‌های دیم و آبی در سال‌های اخیر و تبدیل شهرستان سپیدان به‌عنوان یک منطقه ییلاقی و توریستی به شدت جنگل‌های این گونه را تهدید می‌کند و زادآوری طبیعی آن را مختل نموده و از دیدگاه متخصصین جنگل، یکی از گونه‌های در معرض تهدید استان فارس می‌باشد. برای احیای جنگل‌ها و استفاده از *P. syriaca* به عنوان پایه برای ارقام مختلف تجاری گلابی ضرورت دارد که تکثیر این گونه‌ی ارزشمند در استان فارس مورد بررسی قرار گیرد. عملی بودن تکثیر گونه‌های گلابی وحشی با بذر طی پژوهشی توسط *اکبری موسوی و سعادت* (۱۳۸۵) گزارش شده، اما به دلیل دگرگشن بودن گلابی نهال‌های حاصل از بذر شبیه به اصل نبوده و هرچند گوناگونی ژنتیکی موجود در عرصه‌های طبیعی را بهبود خواهد بخشید، اما در صورت نیاز به تعداد زیاد نهال از یک درخت یا ژنوتیپ برتر، تکثیر رویشی لازم است. با وجودی‌که تکثیر رویشی گلابی با پیوند امکان‌پذیر است، اما در ازدیاد بوسیله پیوند نهال‌های حاصل از بذر به‌عنوان پایه مورد استفاده قرار می‌گیرند و چون گلابی دگرگشن است باعث گوناگونی زیادی در درختان حاصله خواهد شد. در مورد تکثیر این گونه گلابی وحشی با استفاده از قلمه نیز گزارشی در دسترس نیست. بنابراین لازم است که شیوه‌ای مناسب برای ازدیاد انبوه ژنوتیپ‌های برتر آن معرفی گردد و به‌نظر می‌رسد ریزافزایی (micropropagation) یکی از عملی‌ترین شیوه‌ها برای تکثیر *P. syriaca* باشد. گزارش‌های بسیاری در مورد ریزافزایی ارقام مختلف گلابی انجام شده، لیکن در مورد گونه‌های گلابی بومی ایران، پژوهش جامعی انجام نشده است.

بیشتر پژوهش‌های انجام شده در مورد ریزافزایی گلابی معمولی (*Pyrus communis*) می‌باشد که از نظر تجاری اهمیت ویژه‌ای دارد و پژوهش در مورد سایر گونه‌های گلابی به‌طور محدود انجام شده است. طبق منابع موجود در مورد کلیه مراحل ریزافزایی گلابی شامل افزونش شاخساره، ریشه‌زایی، پینه‌زایی، اندام‌زایی، سازگاری گیاهچه‌ها و رویان‌زایی بدنی پژوهش‌هایی انجام و نتایج آن‌ها گزارش شده است. محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS,1962) (Murashige & Skoog)، توسط بیش‌تر پژوهشگران در ریزافزایی گلابی مورد استفاده قرار گرفته است (Predieri & Sun *et al*. 2009; Shibli *et al*. 1997; Govoni, 1998). *کادوتا و نی‌می* (Kadota & Niimi, 2003) از محیط کشت گیاهان چوبی (WPM) (Lloid & McCown, 1981) برای پرآوری شاخساره ارقام گلابی استفاده نموده‌اند. استقرار ریزنمونه‌های گلابی با استفاده از محیط کشت MS با نصف غلظت نمک‌های ماکرو توسط *باویرا و همکاران* (Baviera *et al*. 1989) نیز گزارش شده است. برای نیمه جامد کردن محیط کشت از دیفکو باکتو آگار و به‌ندرت از Gellan gum استفاده شده است (Bell & Reed, 2002).

بیش‌تر پژوهشگران گلابی از سایتوکاینین بنزیل آمینو پیورین (BA) استفاده نموده‌اند (Bell *et al*. 2009; Predieri & Govoni, 1998; Shibli *et al*. 1997; Sun *et al*. 2009) هرچند از زآتین و تو آی پی (2ip) نیز استفاده شده است (Bell & Reed, 2002). گزارش شده که افزایش یک میلی‌گرم در لیتر BA به محیط کشت برای تولید شاخساره در گلابی کافی است، اما مقدار آن براساس نوع گونه و رقم گلابی می‌تواند تغییر یابد (Morreti *et al*. 1991). *براردی و همکاران* (Berardi *et al*. 1992) گزارش نموده‌اند که غلظت بهینه BA برای تولید شاخساره *P. calleryana*، ۰/۵میلی‌گرم در لیتر است. *کادوتا* و *نیمی* (Kadota & Niimi, 2003) گزارش نموده‌اند که BA با غلظت حدود ۲ میلی‌گرم در لیتر حداکثر تعداد شاخساره را در *P. pyrifolia* تولید می‌نماید.

دو روش برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای، مورد استفاده پژوهشگران گلابی قرار گرفته است. نخست انگیزش ریشه با استفاده از غلظت پایین اکسین برای مدت یک هفته و سپس انتقال به محیط کشت بدون اکسین برای نمو ریشه‌ها که در این شیوه بیشتر از محیط کشت MS یا MS با نصف غلظت نمک‌ها و اکسین‌های اسید ایندول بوتیریک (IBA) یا اسید نفتالن استیک (NAA) با غلظت ۲-۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر و هم‌چنین از اسید ایندول استیک (IAA) با غلظت حدود ۲ میلی‌گرم در لیتر استفاده شده است. روش دیگر ریشه‌زایی، فروکردن سریع انتهای شاخساره‌ها در محلول غلیظ IBA با غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای چند ثانیه و سپس انتقال به محیط کشت بدون تنظیم کننده رشد می‌باشد (Bell & Reed, 2002).

شیبلی و همکاران (Shibli *et al*. 1997) گزارش کرده‌اند که آکسین‌های IAA، IBA و NAA موجب ریشه‌زایی درون شیشه‌ای شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای *P. syriaca* می‌شوند و حداکثر ریشه‌زایی (۷۲ درصد) در محیط کشت MS دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA صورت گرفت. *سان و همکاران* (Sun *et al*. 2009) برای ریشه‌دارکردن شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای هم‌گروه‌های گلابی از محیط کشت MS و QL (Quoirin & Lepoivre, 1977) با نصف یا یک چهارم غلظت نمک‌ها استفاده کرده‌اند.

باروس و همکاران (Barros *et al*. 2005) گزارش نموده‌اند که با قرار دادن شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای به طول ۲- ۱/۵ سانتی‌متر در محیط کشت دارای ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر IBA به‌مدت ۴-۲ ساعت در تاریکی ریشه‌زایی اکثر ارقام گلابی با منشا کشور پرتقال و چندین رقم بین‌المللی امکان پذیر و درصد بالایی از نهال‌های تولید شده درون شیشه‌ای بعد از انتقال به خاک به‌خوبی مستقر شدند. *سان و همکاران* (۲۰۰۹) استفاده از محیط کشت‌هایMS با نصف و یک چهارم غلظت نمک‌ها و محیط کشت QL با نصف غلظت نمک‌ها دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA را برای ریشه‌زایی هم‌گروه‌های دیپلوئید، تریپلوئید و تتراپلوئید گلابی معمولی بررسی نموده و گزارش کرده‌اند درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت QL با نصف غلظت نمک‌ها نسبت به محیط کشت‌های MS با نصف و یک چهارم غلظت نمک‌ها برتری معنی‌دار دارد. ایشان ریشه‌زایی را در گلابی، وابسته به ژنوتیپ دانسته و ریشه‌زایی هم‌گروه‌های دیپلوئید را حداکثر گزارش کرده‌اند.

روزبان و همکاران (۱۳۸۱) در مورد ریزافزایی ۹ رقم از ارقام اصلاح شده گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) پژوهشی انجام داده و حداکثر پرآوری شاخساره را بر روی محیط کشت WPM دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA گزارش کرده‌اند. با وجود تلاش‌هایی که نامبردگان برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده انجام داده‌اند، اما با عدم موفقیت در ریشه‌زایی روبرو شدند.

این پژوهش به‌منظور دست‌یابی به شیوه‌ای ساده و کاربردی برای ازدیاد انبوه گلابی وحشی گونه‌ی *P. syriaca* با استفاده از تکنیک ریزافزایی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

در جنگل ده‌کهنه شهرستان سپیدان چندین درخت سالم و در حال رشد فعال *P. syriaca* انتخاب شده و از تنه‌جوش‌ها و شاخه‌های رشد فصل جاری آن‌ها به‌عنوان ریزنمونه استفاده گردید. کشت‌ها در اتاق رشد با دمایی معادل۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد با طول مدت روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۷۵ میکرومول بر مترمربع در ثانیه که توسط لامپ‌های فلورسنت ایجاد می‌گردید، برای رشد قرار داده شدند. محیط‌های کشت در تمام آزمایش‌ها دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بود. مراحل استقرار و اعمال تیمارهای شاخه زایی و ریشه زایی به‌صورت آزمایش‌های مختلف به شرح زیر است.

آزمایش ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف محلول‌های گندزدایی روی استقرار درون شیشه‌ای *P. syriaca*

قطعه‌های ساقه دارای ۴-۳ جوانه جانبی به‌عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا نمونه‌های گیاهی با آب جاری و چند قطره مایع ظرفشویی شسته و به‌منظور کاهش آلودگی قارچی به مدت یک ساعت در محلول یک‌گرم در لیتر بنومیل قرار داده شدند. سپس در زیر هود با جریان هوای یک‌طرفه سترون (Laminar air flow cabinet) مواد گیاهی ابتدا به‌مدت ۱ دقیقه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار داده شدند. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در غلظت‌های مختلف محلول سفیدکننده تجاری (دارای ۵ درصد کلر) یا هیپوکلریت کلسیم ۵ درصد گندزدایی سطحی و سپس با آب مقطر سترون سه بار آبشویی شدند و در پایان ریزنمونه‌های مناسب جدا و روی محیط کشت قرار داده شدند. از محیط کشت MS دارای ۰/۴میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و نیمه جامد شده با ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار برای همه تیمارها استفاده گردید. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی

اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل مایع سفید کننده تجاری با غلظت‌های ۵، ۸ و ۱۰ درصد و همچنین هیپوکلریت کلسیم ۵ درصد بود. هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار از ۵ ریزنمونه تشکیل شده بود. شاخص‌های تعداد ریزنمونه‌های بدون آلودگی قارچی و باکتریایی، تعداد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده و تعداد ریزنمونه‌های رشد کرده بعد از ۳ هفته یادداشت برداری شدند.

آزمایش ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف BA روی شاخص‌های رشد درون شیشه‌ای *P. syriaca*

این آزمایش به‌منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف BA بر افزونش شاخساره در *P. syriaca* انجام شد. قطعات ساقه دارای ۳-۲ جوانه جانبی شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای به‌عنوان ریزنمونه استفاده گردید. محیط کشت DKW دارای ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و نیمه جامد شده با ۲/۲ گرم در لیتر فیتاژل برای همه تیمارها استفاده گردید. آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل غلظت‌های ۰/۵، ۰/۸ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بودند. هر تیمار دارای ۴ تکرار و هر تکرار دارای ۴ ریزنمونه بود. یادداشت برداری از شاخص‌های رشد تعداد شاخساره، طول شاخساره اصلی، وزن تر شاخساره و پینه پس از ۵ هفته انجام گردید.

آزمایش ۳. تاثیر غلظت‌های مختلف IBA و BA روی شاخص‌های ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *P. syriaca*

این آزمایش به صورت فاکتوریل شامل سه غلظت مختلف IBA (۰/۰۱، ۰/۰۵و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور A و دو غلظت مختلف BA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) به عنوان فاکتور B اجرا گردید. از محیط کشت DKW نیمه‌جامد شده با ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار برای همه تیمارها استفاده شد. از شاخساره‌های دو بار زیر کشت داده شده به طول ۷-۵ سانتی‌متر به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. بعد از کشت، شاخساره‌ها در اتاق رشد با ویژگی‌های پیش‌گفته قرار داده شدند. هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار از ۴ شاخساره تشکیل می‌شد. درصد ریشه‌زایی پس از ۵ هفته یادداشت برداری شد.

آزمایش ۴. تاثیر غلظت‌های مختلف IBA روی شاخص‌های ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *P. syriaca*

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار شامل غلظت‌های مختلف IBA (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان محیط کشت انگیزش ریشه انجام شد. هر تیمار دارای ۵ تکرار هر تکرار دارای ۴ شاخساره بود. از محیط کشت DKW با نصف غلظت عناصر ماکرو و نیمه‌جامد شده با ۹ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار به‌عنوان محیط کشت پایه استفاده شد. از شاخساره‌های رشد کرده در شرایط درون شیشه‌ای به طول ۷-۵ سانتی‌متر به‌عنوان ریزنمونه برای ریشه‌زایی استفاده گردید. ابتدا شاخساره‌ها روی محیط کشت انگیزش ریشه کشت و همه آن‌ها در اتاق رشد و شرایط تاریکی به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از طی زمان انگیزش ریشه شاخساره‌ها برای نمو ریشه به گلدان‌های جیفی خیس شده‌ی سترون منتقل و در روشنایی قرار داده شدند. یادداشت‌برداری از درصد ریشه‌زایی پس از ۸ هفته قرار داشتن در گلدان‌های جیفی انجام شد.

آنالیـــــزهای آمـــــاری با استـــفاده از برنامه SAS (SAS Institute, 1988) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج

آزمایش ۱. تاثیر غلظت‌های مختلف محلول‌های گندزدایی روی استقرار درون شیشه‌ای *P. syriaca*

براساس نتایج حاصل از این آزمایش مشخص گردید که بین تیمارهای مختلف گندزدایی مواد گیاهی از نظر درصد ریزنمونه‌های بدون آلودگی قارچی و باکتریایی، درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده و درصد ریزنمونه‌های رشد کرده تفاوت معنی‌دار وجود ندارد (جدول ۱). با وجودی‌که بین تیمارهای مختلف گندزدایی سطحی تفاوت معنی‌دار مشاهده نگردید، اما حداکثر ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده از تیمار مواد گیاهی با هیپوکلریت کلسیم ۵ درصد مشاهده شد که یک ویژگی منفی در استقرار کشت‌های درون شیشه‌ای می‌باشد.

آزمایش ۲. تاثیر غلظت‌های مختلف BA روی شاخص‌های رشد درون شیشه‌ای *P. syriaca*

براساس نتایج حاصل از این آزمایش (جدول۲) ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۱/۰میلی‌گرم در لیتر BA از نظر تعداد شاخساره در ریزنمونه در مقایسه با محیط کشت‌های دارای ۰/۸ و ۰/۵ میلی‌گرم در

لیترBA به طور معنی‌دار برتری داشتند. ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BAاز نظر تعداد شاخساره در ریزنمونه در مقایسه با محیط کشت‌های دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نیز به‌طور معنی‌دار برتری داشتند. ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای غلظت‌های مختلف BA از نظر شاخص رشد میانگین طول شاخساره اصلی در ریزنمونه با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند.

جدول ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم و کلسیم روی استقرار کشت‌های درون شیشه‌ای *Pyrus syriaca* پس از ۳ هفته[¥]

Table 1: The effects of different concentrations of commercial bleach and calcium hypochlorite on establishment of *in vitro* cultures of *Pyrus syriaca* after 3 weeks [¥]

تیمارهای مختلف گندزدایی سطحی Disinfection treatments	درصد ریزنمونه‌های بدون آلودگی قارچی Explants free of fungial contamination (%)	درصد ریزنمونه‌های بدون آلودگی باکتریایی Explants free of bacterial contamination (%)	درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده Brown explants (%)	درصد ریزنمونه‌های رشد کرده Growing explants (%)
محلول ۵ درصد سفیدکننده تجاری Commercial bleach solution (5%)	95[a]	100[a]	10[a]	65[a]
محلول ۸ درصد سفیدکننده تجاری Commercial bleach solution (8%)	100[a]	100[a]	31.3[a]	68.8[a]
محلول ۱۰ درصد سفیدکننده تجاری Commercial bleach solution (10%)	100[a]	100[a]	20.0[a]	65[a]
محلول ۵ درصد هیپوکلریت کلسیم Calcium hypochlorite solution (5%)	100[a]	70[a]	45[a]	55[a]

[¥] میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشابه هستند در سطح ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند

[¥]Values in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.05) using Duncan's multiple range test

جدول ۲: تأثیر غلظت‌های مختلف BA روی شاخص‌های رشد درون شیشه‌ای *Pyrus syriaca*[¥]

Table 2: The effects of different concentrations of BA on *in vitro* growth indices of *Pyrus syriaca* [¥]

غلظت BA (میلی‌گرم در لیتر) BA concentration (mgl^{-1})	میانگین تعداد شاخساره در ریزنمونه Shoot number per explant	میانگین طول شاخساره اصلی در ریزنمونه (سانتی‌متر) Main shoot length per explants (cm)	وزن تر شاخساره در ریزنمونه (گرم) Shoot fresh weight per explant (g)	وزن تر پینه در ریزنمونه (گرم) Callus fresh weight per explant (g)
0.5	2.19[c]	3.41[a]	0.26[b]	0.36[b]
0.8	3.33[b]	3.81[a]	0.31[ab]	0.55[a]
1.0	4.31[a]	4.17[a]	0.41[a]	0.37[b]

[¥]میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسان هستند از نظر آماری در سطح ۱ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند

[¥]Values in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) using Duncan's multiple range test

ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BA از نظر وزن تر شاخساره در ریزنمونه در مقایسه با محیط کشت‌های دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA به‌طور معنی‌دار برتری داشتند، اما با ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر BA تفاوت معنی‌دار نداشتند. حداکثر وزن تر پینه در نمونه‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۰/۸میلی‌گرم در لیتر BA حاصل شد که به‌طور معنی‌دار از ریزنمونه‌های کشت

شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۱/۰ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA بیش‌تر بود (جدول ۲).

آزمایش ۳. تاثیر غلظت‌های مختلف IBA و BA روی شاخص‌های ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *P. syriaca*

براساس نتایج حاصل از این آزمایش مشخص گردید که بین غلظت‌های مختلف IBA از نظر درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی‌دار وجود ندارد هرچند بیش‌ترین درصد ریشه‌زایی از کشت شاخساره‌ها بر روی محیط کشت DKW دارای ۰/۰۱میلی‌گرم در لیتر IBA حاصل گردید. افزودن BA به محیط کشت روی ریشه‌زایی تاثیر منفی داشت و بین غلظت‌های مختلف BA از نظر درصد ریشه‌زایی تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت بدون BA، ۶۲/۵ درصد ریشه‌زایی داشتند که به‌طور معنی‌دار ریشه‌زایی آن‌ها از شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BA بیش‌تر بود (جدول ۳).

آزمایش ۴. تاثیر غلظت‌های مختلف IBA روی شاخص‌های ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *P. syriaca*

براساس نتایج حاصل از این آزمایش مشخص گردید که شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت دارای ۷۵ میلی‌گرم در لیتر IBA در مقایسه با شاخساره‌هایی که بر روی محیط کشت دارای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر IBA کشت شده بودند به طور معنی‌داری دارای درصد ریشه‌زایی بیش‌تر بودند (جدول ۴) و تمام شاخساره‌ها تولید ریشه نمودند. درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های کشت شده بر روی محیط کشت‌های دارای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند. انتقال شاخساره‌های ریشه‌دار شده درون گلدان‌های جیفی به گلدان‌های بزرگتر دارای مخلوط ورمی‌کولایت و پیت خزه با موفقیت انجام و به رشد خود ادامه دادند.

جدول ۳: تأثیر غلظت‌های مختلف IBA و BA بر درصد ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *P. syriaca* ¥

Table 3: The effects of different concentrations of BA and IBA on *in vitro* rooting of *Pyrus syriaca* ¥

درصد ریشه‌زایی Rooting percentage	غلظت IBA IBA concentration
54.17[a]	۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، 0.01 mgl^{-1}
20.83[a]	۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر، 0.05 mgl^{-1}
45.00[a]	۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، 0.1 mgl^{-1}
	غلظت BA BA concentration
62.5[a]	صفر میلی‌گرم در لیتر، 0.0 mgl^{-1}
7.14[b]	۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، 0.1 mgl^{-1}
ns	برهمکنش، Interaction

¥میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسان هستند از نظر آماری در سطح ۱ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند

[ns]برهمکنش غلظت‌های مختلف BA و IBA معنی‌دار نیست

¥Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) using Duncan's multiple range test

[ns]The interaction of different concentrations of BA and IBA are not significantly different

جدول ۴. تاثیر غلظت‌های مختلف IBA بر درصد ریشه‌زایی درون شیشه‌ای *Pyrus syriaca* ¥

Table 4. The effects of different concentrations of IBA on *in vitro* rooting of *Pyrus syriaca* ¥.

درصد ریشه‌زایی Rooting percentage	غلظت IBA در محیط کشت انگیزش ریشه IBA concentration in root induction medium
95[ab]	۲۵ میلی‌گرم در لیتر، 25 mgl^{-1}
95[ab]	۵۰ میلی‌گرم در لیتر، 50 mgl^{-1}
100[a]	۷۵ میلی‌گرم در لیتر، 75 mgl^{-1}
75[b]	۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، 100 mgl^{-1}

¥میانگین‌های هر ستون که دارای حروف یکسان هستند از نظر آماری در سطح ۱ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی دار ندارند

¥Means in each column followed by the same letter are not significantly different (P<0.01) using Duncan's multiple range test

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استقرار نمونه‌های گرفته شده از عرصه‌های طبیعی جنگلی و گندزدایی آن‌ها با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه و محلول ۱۰-۵ درصد سفیدکننده‌ی تجاری امکان پذیر است(جدول ۱) و مشکل اساسی برای استقرار کشت‌های بدون آلودگی از درختان بالغ گونه‌ی *P. Syriaca* وجود ندارد. با وجودی‌که درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده *P. syriaca* در اثر گندزدایی سطحی با استفاده از غلظت‌های مختلف و محلول ۵ درصد هیپوکلریت کلسیم با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند، اما بیش‌ترین درصد (۴۰ درصد) قهوه‌ای شدن و کم‌ترین درصد ریزنمونه‌های رشد کرده (۵۵ درصد) در ریزنمونه‌های گندزدایی شده با محلول ۵ درصد هیپوکلریت کلسیم مشاهده گردید. چون مدت گندزدایی در همه تیمارها یکسان بود بنابراین، قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها به‌دلیل غلظت بالاتر کلر در محلول هیپوکلریت کلسیم می‌باشد که به بافت‌های گیاهی صدمه وارد نموده است. کمترین درصد ریزنمونه‌های قهوه‌ای شده در ریزنمونه‌های گندزدایی شده با محلول سفیدکننده ۵ درصد حاصل گردید که نشان از کمتر صدمه دیدن بافت‌های گیاهی گونه‌ی *P. syriaca* از محلول گندزدا می‌باشد و بنابراین محلول ۵ درصد سفیدکننده تجاری برای گندزدایی سطحی و استقرار نمونه‌های منشا گرفته از درختان بالغ این گونه توصیه می‌شود.

در این پژوهش از BA با غلظت‌های متفاوت به عنوان سایتوکاینین در آزمایش‌های افزونش شاخساره استفاده شد و مشخص گردید برای تولید شاخساره در گونه‌ی *P. syriaca* مناسب است. سایتوکاینین BA توسط بیشتر پژوهشگران گلابی مورد استفاده قرار گرفته است (*سان و همکاران*، ۲۰۰۹؛ *شیبلی و همکاران*، ۱۹۹۷؛ *پریدایری و گاونی*، ۱۹۸۸؛ *بل و همکاران*، ۲۰۰۹) و برتری آن نسبت به کاینتین، TDZ و CPPU توسط *کادوتا* و *نی‌می* (۲۰۰۳) نیز گزارش شده است. گزارش شده که افزایش یک میلی‌گرم در لیترBA به محیط کشت برای استقرار و افزونش شاخساره گلابی کافی است، اما مقدار آن براساس نوع گونه و رقم گلابی می‌تواند تغییر یابد (*مورتی و همکاران*، ۱۹۹۱). *براردی و همکاران* (۱۹۹۲) گزارش نموده‌اند که غلظت مطلوب BA برای شاخه‌زایی *Pyrus calleryana* به‌میزان ۵/۰ میلی‌گرم در لیتر بوده است. نتایج این پژوهش نشان داد که غلظت‌های مختلف استفاده شده BA روی شاخص‌های تعداد شاخساره، وزن تر شاخساره و وزن تر پینه در هر ریزنمونه تفاوت معنی‌دار داشت (جدول ۲). در غلظت‌های کم BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) برگ‌های شاخساره‌ها درشت‌تر و شاداب‌تر بودند و تعداد شاخساره تولید شده هم کم‌تر بود (جدول ۲). در غلظت‌های ۰/۵ تا ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر BA تعداد شاخساره با کیفیت قابل قبول تولید شد و برای ریشه‌دار کردن مناسب‌تر بودند و موافق با گزارش‌های *براردی و همکاران* (۱۹۹۲) و *مورتی و همکاران* (۱۹۹۱) نیز هست. استفاده از غلظت‌های کم BA (۰/۲ یا ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر) برای استقرار نمونه‌های منشا گرفته از درختان بالغ توصیه می‌شود (جدول ۱).

برای ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای *P. syriaca*، دو روش کلی بکار گرفته شد. نخست افزایش اکسین به محیط کشت با غلظت‌های کم برای رشد و نمو توام ریشه‌ها و دیگری ریشه‌زایی در دو مرحله جداگانه انگیزش ریشه در حضور اکسین با غلظت زیاد برای مدت زمان کوتاه و سپس انتقال شاخساره‌ها به محیط کشت بدون هورمون یا گلدان‌های جیفی برای نمو ریشه‌ها. در شیوه افزایش اکسین به محیط کشت با غلظت‌های کم حداکثر ۵۴ درصد ریشه‌زایی (جدول ۳) حاصل گردید. *شیبلی و همکاران* (۱۹۹۷) ۷۲درصد ریشه‌زایی را با استفاده از محیط کشت MS دارای ۳ میلی‌گرم در لیتر IBA در *P. syriaca* گزارش کرده‌اند. درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های تولید شده درون شیشه‌ای *P. syriaca* در این آزمایش کمتر از گزارش *شیبلی و همکاران* (۱۹۹۷) بود که احتمالا به دلیل غلظت کمتر IBA می‌باشد. افزودن BA به محیط کشت DKW تاثیر منفی روی درصد ریشه‌زایی *P. syriaca* نشان داد و در مقایسه با محیط کشت‌های بدون BA کاهش معنی‌دار داشت (۷/۱۴ درصد در مقایسه با شاهد که ۶۲/۵ درصد ریشه‌زایی داشت، جدول ۳). این تاثیر منفی روی کاهش ریشه‌زایی احتمالا به دلیل خاصیت ضد آکسینی سایتوکاینین‌ها می‌باشد. هرچند *مارتینلی* (Martinelli, 1985) گزارش نموده که افزودن ۰/۰۰۳میلی‌گرم در لیتر کاینتین به محیط کشت دارای ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر IBA برای ریشه‌زایی پایه‌های *Prunus* تاثیر مثبت داشت.

با استفاده از شیوه ریشه‌زایی در دو مرحله جداگانه انگیزش ریشه در حضور اکسین با غلظت زیاد برای مدت زمان کوتاه و سپس انتقال شاخساره‌ها به گلدان‌های جیفی برای نمو ریشه‌ها پیشرفت زیادی در ریشه‌زایی و بقای گیاهچه‌ها

(Plantlets) حاصل گردید. غلظت IBA در محیط کشت انگیزش ریشه از ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر متفاوت بود که غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر مناسب‌ترین بود (جدول ۴). افزایش غلظت IBA به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش معنی‌دار درصد ریشه‌زایی نسبت به محیط کشت دارای ۷۵ میلی‌گرم در لیتر شد. این امر به میزان نیاز گیاهان به آکسین برای ریشه‌زایی بستگی دارد. به نظر می‌رسد افزایش غلظت IBA به ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای انگیزش ریشه فراتر از سطح بهینه نیاز *P. syriaca* باشد و موجب کاهش معنی‌دار درصد ریشه‌زایی گردیده است. تولید بافت پینه و ریشه‌های کلفت و کوتاه نیز از تاثیرهای نامطلوب غلظت‌های زیاد آکسین می‌باشد که موجب کاهش زنده‌مانی گیاهچه‌های تولید شده درون شیشه‌ای بعد از انتقال به‌خاک می‌گردد.

استفاده از گلدان‌های جیفی بر اساس تجارب قبلی در ریشه‌زایی گردو (*سعادت و هنرتی*، ۱۹۹۹) موجب پیشرفت چشمگیری در ریشه‌زایی گلابی وحشی شد و منجر به ۱۰۰ درصد ریشه‌زایی شاخساره‌های *P. syriaca* (جدول ۴) گردید. این اولین گزارش ریشه‌زایی دومرحله‌ای در گونه‌های مختلف گلابی وحشی است که از گلدان‌های جیفی برای نمو ریشه‌ها استفاده گردیده است. تمام گیاهچه‌های تولید شده در گلدان‌های جیفی به گلدان معمولی منتقل و در گلخانه رشد نمودند. استفاده از گلدان‌های جیفی برای نمو ریشه‌های گلابی وحشی دارای برتری‌های زیر خواهد بود.

گلدان‌های جیفی از پیت خزه خالص ساخته شده و دارای تمام عنصرهای مورد نیاز برای تامین رشد سالم گیاه می‌باشند. ریشه‌هایی که در گلدان‌های جیفی رشد می‌کنند، نازک، قابل انعطاف و دارای ریشه‌های ثانویه می‌باشند که یک عامل مهم برای زنده‌مانی و رشد گیاهچه‌ها می‌باشد و در مقایسه با ریشه‌های کلفت، شکننده و بدون ریشه‌های ثانویه که در محیط‌های ژله‌ای به‌وجود می‌آیند، بهتر می‌باشند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در داخل گلدان‌های جیفی را به‌راحتی می‌توان در داخل گلدان‌های بزرگ‌تر و یا در خزانه کاشت، بدون اینکه کمترین صدمه‌ای به ریشه‌های آن‌ها وارد شود. این روش منجر به درصد زنده‌مانی بالای گیاهچه‌ها بعد از انتقال آن‌ها به گلدان و شرایط برون شیشه می‌شود. علاوه بر این با استفاده از گلدان‌های جیفی یک مرحله پرهزینه و مشکل انتقال ریز شاخساره‌ها از محیط انگیزش ریشه به محیط نمو ریشه و سپس سازگار نمودن آن‌ها حذف می‌گردد و یک روش مناسب برای صرفه‌جویی در زمان و سرمایه برای ازدیاد انبوه گونه‌های مختلف گلابی وحشی می‌باشد

تشکر و قدردانی

از رئیس محترم وقت مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس جناب آقای دکتر مهرداد محمدنیا که امکانات اجرای این پروژه را فراهم نمودند سپاسگزاری می‌گردد. خانم مهندس لیلا سیاح در انجام آزمایش‌ها به‌طور صمیمانه همکاری نمودند که زحمت‌های ایشان شایسته تقدیر است.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۲-۱ متن انگلیسی مراجعه شود.

Micropropagation of Wild Pear (*Pyrus syriaca*)

Saadat[1]*, Y. A., Mousavi[2], B. and Beheshti Rooy[3], SH.

Abstract

Fars province is one of the natural habitats of *Pyrus syriaca* in Iran. Harvesting of fruits, deforestation, expansion of agriculture and overgrazing in recent years imposed detrimental effects on natural regeneration of this species. This research was carried out to develop tissue culture techniques for easy, rapid and mass propagation of *P. syriaca*. Shoot tips and nodal segments of current season growth shoots of selected trees in Deh-Kohne open forest in Sepidan County, Fars province, Iran were used as explants. Cultures free of contamination were established on MS medium containing 0.4 mgl^{-1} BA, 0.01 mgl^{-1} IBA. Concentration of 0.8 or 1.0 mgl^{-1} BA was optimum for shoot multiplication. The best procedure for rooting of *in vitro* produced shoots consisted of two phases: *in vitro* root induction and *ex vitro* root development. For root induction, *P. syriaca* shoots were cultured on DKW medium (half strength macronutrients) containing 75 mgl^{-1} IBA and incubated in the darkness for 24 hours. For root development, shoots were transferred from root induction medium to moistened Jiffy-7 pots. Using this method 100 percentage of shoots rooted. Inclusion of 0.1 mgl^{-1} BA in nutrient media had negative effects on rooting of *P. syriaca* shoots and significantly decreased rooting percentage.

Keywords: DKW nutrient medium, rooting, shoot multiplication, wild pear

References

Akbari Mousavi, Z. and Saadat, Y. A. 2006. Breaking dormancy and germination of wild pear (*Pyrus spp*) seeds. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14: 92-104 (In Persian with English abstract).

Barros, M. T. F., Hipolito, C. I. and Baptisa, C. G. M. 2005. *In vitro* rooting of Portuguese pear cultivars (*Pyrus communis*) in response to changes in auxin induction and dark period treatments. Acta Horticulturae, 671: 631-636.

Baviera, J. A., Garcia, J. L. and Ibarra, M. 1989. Commercial *in vitro* micropropagation of pear cv Conference. Acta Horticulturae, 256: 63-68.

Bell, R. L. and Reed, B. M. 2002. *In vitro* tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Acta Horticulturae, 596: 412-418.

Bell, R. L., Srinivasan, C. and Lomberk, D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In vitro* Cellular and Developmental Biology- Plant, 45: 708-714.

1. Research Assistant Professor, Research Center for Agriculture and Natural Resources of Fars Province, Shiraz
2. Master of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol
3. Master of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
*: Corresponding Author **Email**: saadat@farsagres.ir

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

Hamzepour, M. and Bordbar, K. 1999. Studying some of the characteristics of *Lonicera nummularifolia* in Sepidan region. Pajouhesh-va-Sazandegi, 40, 41, 42: 73-75 (In Persian with English abstract).

Kadota, M. and Niimi, Y. 2003. Effects of cytokinion types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivars shoots. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 72: 201-265.

Khatamsaz, M. 1992. Flora of Iran, No. 6: Rosaceae, Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran, Iran, 352p. (In Persian).

Lloyd, G. and McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia,* by the use of shoot tip culture. Proceeding of Plant Propagation society, 30: 421-427.

Martinelli, A. 1985. Factors affecting *in vitro* propagation of the peach almond hybrids 'Hansen 536'. Acta Horticulturae, 173: 237-244.

McGranahan, G. H., Driver, A. and Tulecke, W. 1987. Tissue culture of *Juglans.* In: Bonga, G. M. and Durzan, D. J. (eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry,* Vol. 3, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, 261-271.

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

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

Predieri, S. and Govoni, M. 1998. *In Vitro* propagation of compact pear clones. Acta Horticulturae, 475: 127-134.

Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved media for *in vitro* cultures of *Prunus* sp. Acta Horticulturae, 78: 437-442.

Roozban, M. R., Arzani, K. and Moieni, A. 2002. Study on *in vitro* propagation of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cultivars. Seed and Plant, 18: 348-361.

Saadat, Y. A. and Hennerty, M. J. 1999. The effects of different *in vitro* and *ex vitro* treatments on rooting performance of Persian walnut (*Juglans regia* L.). Acta Horticulturae, 544: 473-480.

SAS Institute., 1988. SAS/STAT User's Guide. Release 6.03, Statistical Analysis System (SAS) Institute, Inc., Cary, N.C., USA.

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

Sun, Q., Sun, H. and Bell, R. L. 2009. Effect of polyvinyl alcohol on *in vitro* rooting capacity of shoots in pear clones (*Pyrus communis* L.) of different ploidy. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 99: 299-304.

Zamani, A., Attar, F. and Maroofi, H. 2012. A synopsis of the genus *Pyrus* (Rosaceae) in Iran. Nordic Journal of Botany, 30: 310-312.