ریزازدیادی و انطباق گیاهچه‌های ریزازدیادی شده گلابی نطنزی (*Pyrus communic* cv. Natanzi) با محیط برون شیشه‌ای به کمک قارچ میکوریزا

عظیمه حاجی صادقیان نجف‌آبادی[۱]، ایمان روح‌الهی*[۲]، زهرا آقچه کهریزی[۳]، سید عبدالله هاشمی بابا حیدری[۴]، آیت‌الله رضایی نودهی[۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد

[۲*و ۵] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد

[۳] مدیر عامل شرکت دانش بنیان آتیژن

[۴] استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شاهد

* نویسنده مسئول: i.rohollahi@shahed.ac.ir

چکیده

گلابی نطنزی از ارقام مهم تجاری و بومی ایران، از گروه گلابی‌های اروپایی است. ریزازدیادی امکان تولید گیاهچه‌های یکسان و مشابه گیاه مادری را فراهم خواهد نمود. در پژوهش حاضر با هدف تکثیر و ریشه‌دار کردن گیاهچه‌های گلابی نطنزی در محیط کشت موراشینگ و اسکوک (۱۹۶۲) (MS) برهم‌کنش سطوح مختلف هورمون‌های بنزیل آدنین (BA) و ایندول ۳- بوتیریک اسید (IBA) بر شاخه‌زایی و در مرحله ریشه‌زایی سطوح مختلف هورمونی IBA مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با هدف بهبود انطباق گیاهچه‌ها با محیط خارج از شیشه تأثیر بستر کشت و قارچ میکوریزا طی آزمونی به‌صورت فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی انجام شد. بیشترین شاخه‌زایی در برهم‌کنش بین غلظت سه میلی‌گرم در لیتر هورمون BA و نیم میلی‌گرم در لیتر IBA و بیشترین درصد ریشه‌زایی در تیمار دو هفته تاریکی حاوی یک و نیم میلی‌گرم در لیتر هورمون IBA ثبت شد. در مرحله سازگاری، صد درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با محیط منطبق شدند. کلونیزاسیون در همه تیمارها مشاهده و غلظت فسفر و خصوصیات مرفولوژیکی ریشه در بستر پیت ماس در حضور قارچ میکوریزا بیشتر اندازه‌گیری شد. در نهایت برای ریزازدیادی گلابی نطنزی استفاده از هورمون BA و IBA و برای ریشه‌زایی تیمار تاریکی هورمون IBA توصیه می‌شوند. استفاده از قارچ میکوریزا در بستر پیت ماس با بهبود ویژگی‌های ریشه جهت افزایش سازگاری و انطباق با محیط مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: **کشت بافت، سازگاری، قارچ همزیست ریشه**

مقدمه

گلابی نطنزی (*Pyrus communis* cv. Natanzi) از ارقام مهم تجاری بسیار با کیفیت و خوش طعم و عطر بومی ایران است. خواستگاه این گلابی در روستای طامه، روستای کوچکی از توابع شهرستان نطنز می‌باشد. این رقم در اواخر پاییز و اوایل زمستان به بازار عرضه می‌گردد (Jalili Marandi, 2010). معمولاً گونه‌های گلابی درختانی سخت‌ریشه‌زا هستند (Fadl and Hartmann, 1967).

محیط کشت MS توسط بیش‌تر پژوهشگران در ریزازدیادی گلابی مورد استفاده قرار گرفته است؛ هم‌چنین استفاده از سایتوکاینین BA برای پرآوری پرکاربردتر بوده است (Predieri and Govoni, 1997) و بیشتر از آگار برای ژله‌ای کردن محیط استفاده شده است (Reed and Bell, 2002).

ریشه‌زایی امری وابسته به ژنوتیپ است. برای ریشه‌زایی از اکسین‌ها و غلظت‌های مختلف آن برحسب شرایط متفاوت بافت و محیط کشت استفاده می‌شود (Mansseri-Lamrioui *et al.*, 2011). اثر مثبت تاریکی در القای ریشه‌زایی سیب و گلابی توسط محققان ثابت شده است (Berardi *et al.*, 1993).

از مشکلات تولید گیاهان از طریق ریزازدیادی مرحله سازگاری گیاهچه می‌باشد. بقاء کم و رشد ضعیف گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در شرایط درون شیشه‌ای پس از انتقال به محیط، استفاده از کشت بافت را محدود می‌کند. قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار(*Arbuscular Mycorrhizael*) یکی از فراوان‌ترین قارچ‌ها در طبیعت هستند و در اکثر گیاهان دیده می‌شوند (Shah, 2014). تلقیح گونه‌های گیلاس (*Prunus avium*) ریزازدیادی با این قارچ‌ها در هنگام سازگاری با محیط بیرون باعث افزایش مقاومت گیاه و افزایش جذب مواد غذایی از بستر، افزایش بازده و بهبود ویژگی‌های تجاری شده است (Cordier *et al.*, 1996). تلقیح ریشه‌ها با قارچ در هنگام سازگاری پایه‌های کلونی گلابی (Rapparini *et al.*, 1996) و سیب (Schubert and Lubraco, 2000) افزایش تحریک رشد گیاه را نشان دادند.

طی تحقیق انجام شده بعد از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف BAP و IBA بر شاخه‌زایی و استفاده از چهار غلظت هورمونی IBA بر ریشه‌زایی نمونه‌های گلابی نطنزی، تأثیر قارچ میکوریزا بر رشد و نمو ریشه و جذب فسفر از بستر و در نهایت افزایش سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی با شرایط برون شیشه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مرحله شاخه‌زایی محیط MS با برهم‌کنش غلظت‌های مختلف هورمونی BA (صفر، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) و IBA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) آماده شد. در مرحله ریشه‌زایی ابتدا گیاهچه‌ها به محیط MS حاوی چهار غلظت IBA (صفر، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) انتقال داده شدند. تیمارها در فیتوترون قرار داده شدند. هر تیمار ریشه‌زایی در دو مکان تاریک و روشن در فیتوترون قرار گرفت. بعد از شش هفته میزان شاخه‌زایی و درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار ثبت گردید.

در مرحله انتقال ریزنمونه‌های ریشه‌دار شده به محیط برون شیشه از دو بستر پیت ماس و پرلیت (۱:۱) و کوکوپیت و پرلیت (۱:۱) جهت استقرار استفاده شد. تلقیح هر ۵۰ گرم بستر با استفاده از ۱۰ گرم آمیخته خاکی حاوی ۳۰۰ تا ۴۰۰ اسپور قارچ میکوریزا گونه *Glomus intraradices* و *G. mosseae* انجام گرفت. گیاهچه‌ها در شرایط کنترل شده نوری، دمایی و رطوبت قرار داده شدند و بعد از مدت هشت هفته گیاهچه‌ها از بستر خارج شدند. با استفاده از نرم‌افزار Camscaner از ریشه عکس‌برداری شد. میانگین قطر ریشه (cm) و تعداد ریشه توسط نرم‌افزار Giaroots و میزان عنصر فسفر برگ به روش طباطبایی (۲۰۱۳) و درصد کلونیزاسیون به روش فیلیپس و هایمن (۱۹۷۰) ثبت و مقایسه گردید.

نتایج حاصل از این آزمایش که به‌صورت آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در هر تکرار سه مشاهده انجام گرفت، با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD صورت گرفت و نمودارها در نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد برهم‌کنش غلظت‌های مختلف IBA×BA بر میانگین شاخه‌زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. مقایسه تعداد جوانه جانبی نشان داد شاخه‌زایی در محیط کشت واجد BA با غلظت سه میلی‌گرم در لیتر به همراه IBA با غلظت نیم میلی‌گرم در لیتر به نحو معنی‌داری بیشتر بوده است (شکل۱). مطابق نتایج گزارش شده در این تحقیق استفاده از ترکیب BA×IBA در محیط کشت *P. elaeagrifolia* (Aygun and Dumanoglu, 2015) در مرحله استقرار و شاخه‌زایی موفقیت‌آمیز گزارش شده است.

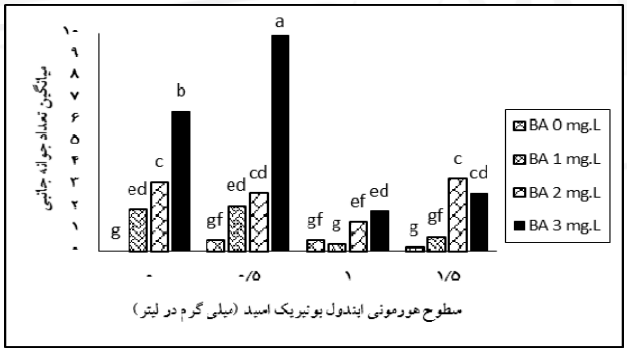
بهترین ریشه‌زایی در محیط کشت MS با تیمار IBA با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر محیط تاریک ۵۶ درصد ثبت شد. نتایج مشاهده شده همسو با گزارش در مورد *P. elaeagrifolia* (Aygun and Dumanoglu, 2015) و پایه‌های گلابی(Yeo and Reed, 1995) می‌باشد.

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر متقابل معنی‌داری را بین بستر کاشت و قارچ میکوریزا در مرحله سازگاری گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی بر میانگین قطر ریشه و غلظت فسفر برگ در سطح احتمال یک درصد و بر تعداد ریشه در سطح احتمال پنج درصد اثر نشان می‌دهد. همچنین بیانگر اثر معنی‌دار درصد کلونیزاسیون بین تیمار قارچ میکوریزا در سطح احتمال یک درصد می‌باشد. تأثیر معنی‌دار قارچ *G.mosseae* در بستر پیت ماس بر میانگین قطر ریشه گلابی نطنزی مشاهده شده است (شکل a–۲). در بستر کوکوپیت شاهد نسبت به سایر تیمارها تعداد ریشه افزایش معنی‌داری داشته است (شکل b–۲). با کمک قارچ میکوریزا بهبود سیستم ریشه‌ای توت‌فرنگی (Norman *et al.*, 1996) گزارش شده است. در گیاهچه‌های گلابی نطنزی میزان فسفر تیمار شاهد در بستر پیت ماس به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها ثبت گردید (شکل c–۲). تفاوت معنی‌دار کلونیزه شدن تیمارهای آلوده شده با قارچ در گلابی نطنزی و تیمار شاهد مشهود است (شکل d–۲). آلوده شدن تمامی گیاهچه‌های پایه سیب MM106 تحت تیمار قارچی نیز گزارش شده است (Schubert and Lubraco, 2000) مطابق با گزارش ارائه شده در پایه‌های سیب M9 و M26 (Gianinazzi, 1992) نتایج غلظت فسفر برگ و درصد کلونیزاسیون ریشه گلابی نطنزی (شکل d و c-۲) نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین غلظت فسفر و درصد کلونیزاسیون وجود نداشته است. تلقیح با قارچ میکوریزا در مرحله سازگاری گیاهچه‌ها با محیط بیرون باعث افزایش ویژگی‌های رشدی ریشه می‌گردد. زنده‌مانی گیاهچه و میزان کلونیزاسیون مستقل از بستر و غلظت فسفر مستقل از کلونیزاسیون می‌باشد؛ همچنین بستر پیت ماس باعث افزایش فسفر اندام هوایی می‌گردد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات تنظیم کنندگان رشد بر شاخه زایی ریزنمونه‌های گلابی نطنزی

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات تعداد جوانه
تیمار هورمونی بنزیل آدنین(BA)	۳	۵۴/۷۷**
تیمار هورمونی ایندول بوتیریک اسید (IBA)	۳	۱۸/۳۵**
BA×IBA	۹	۹/۳۷**
خطا	۳۲	۰/۳۴
درصد ضریب تغییرات		۲۴/۷۸

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

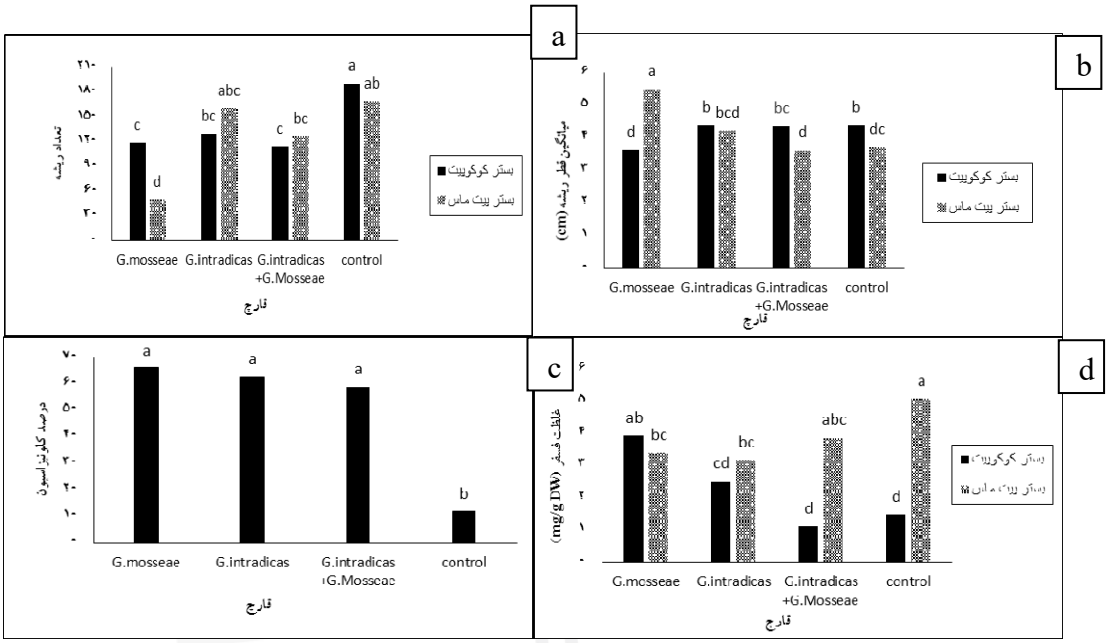


شکل ۱- مقایسه میانگین سطوح مختلف IBA×BA بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های گلابی نطنزی با استفاده از آزمون LSD (α=۰/۰۱). حروف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس میانگین قطر و تعداد ریشه، غلظت فسفر برگ و درصد کلونیزاسیون گیاهچه‌های گلابی نطنزی تحت تأثیر بسترهای کشت و قارچ‌های میکوریزا

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		میانگین قطر (cm)	تعداد ریشه	غلظت فسفر (mg/g DW)	کلونیزاسیون (٪)
بستر کاشت	۱	۰/۰۴^{ns}	۱۱/۶۸×۱۰^{۲ns}	۱۵,۶۵**	۱۱۰,۵۱^{ns}
قارچ میکوریزا	۳	۰/۵۵^{ns}	۱۲/۸۳×۱۰^{۳**}	۱,۵۹^{ns}	۳۹۱۷,۱۲**
قارچ × بستر	۳	۲/۹۹**	۳۷/۶۴×۱۰^{۲*}	۵,۳۸**	۲۷۵,۴۵^{ns}
خطا	۲۴	۰/۲۱	۹۹۴/۴	۰,۶۷	۱۳۹,۰۱
درصد ضریب تغییرات		۱۰/۷۶	۲۳/۸۷	۲۶,۶۲	۲۳,۶۶

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱درصد



شکل ۲- تأثیر قارچ میکوریزا و بستر بر ویژگی‌های رشدی ریشه (a و b)، غلظت فسفر(c) و درصد کلونیزاسیون (d) گیاهچه‌های گلابی نطنزی با استفاده از آزمون LSD (α=۰/۰۱). حروف مشترک نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

منابع

Al-Maarri, K., Arnaud, Y. and Miginiac, E. 1994. Micro propagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane'seedlings and cultivar 'Williams': Factors affecting root formation in vitro and ex vitro. *Scientia horticulturae*, *58*(3), 207-214.

Aygun, A. and Dumanoglu, H. 2015. In vitro shoot proliferation and in vitro and ex vitro root formation of *Pyrus elaeagrifolia* Pallas. *Frontiers in plant science*, *6*.

Berardi, G., Infante, R. and Neri, D. 1993. Micro propagation of *Pyrus calleryana* Dcn. from seedlings. *Scientia horticulturae*, *53*(1-2), 157-165.

Cordier, C., Trouvelot, A., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. 1996. *Arbuscular mycorrhiza* technology applied to micro propagated *Prunus avium* and to protection against Phytophthora cinnamomi. *Agronomie*, *16*, 679-688.

Fadl, M. S. and Hartmann, H. T. 1967. Isolation, purification, and characterization of an endogenous root-promoting factor obtained from basal sections of pear hardwood cuttings. *Plant Physiology*, *42*(4), 541-549.

Gianinazzi, S. 1992. Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage.

Jalili Marandi, R. 2010. *Growing fruits temperate regions*. (In Farsi)

Mansseri-Lamrioui, A., Louerguioui, A., Bonaly, J., Yakoub-Bougdal, S., Allili, N. and Gana-Kebbouche, S. 2011. Proliferation and rooting of wild cherry: The influence of cytokinin and auxin types and their concentration. *African Journal of Biotechnology*, *10*(43), 8613-8624.

Norman, J. R., Atkinson, D. and Hooker, J. E. 1996. *Arbuscular mycorrhizal* fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogenPhytophthora fragariae. *Plant and Soil*, *185*(2), 191-198.

Phillips, J. M. and Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-*arbuscular mycorrhizal* fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, *55*(1), 158IN16-161IN18.

Predieri, S. and Govoni, M. 1997. In vitro propagation of compact pear clones. In *VII International Symposium on Pear Growing* 475, 127-134.

Rapparini, F., Baraldi, R. and Bertazza, G. 1996. Growth and carbohydrate status of *Pyrus communis* L plantlets inoculated with Glomus sp. *Agronomie-Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement*, *16*(10), 653-662.

Reed, B. M. and Bell, R. L. 2002. In vitro tissue culture of pear: advances in techniques for micro propagation and germplasm preservation. In *VIII International Symposium on Pear 596*, 412-418.

Schubert, A. and Lubraco, G. 2000. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micro propagated apple rootstocks during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. *Applied Soil Ecology*, *15*(2), 113-118.

Shah, M. A. 2014. *Mycorrhizas: novel dimensions in the changing world* (p. 87). Heidelberg: Springer.

Tabatabai, S. J. 2013. Mineral nutrition of plants. Tabriz University, Tabriz. (In Farsi)

Yeo, D. Y. and Reed, B. M. 1995. Micro propagation of three *Pyrus* rootstocks. *HortScience*, *30*(3), 620-623.

Micro Propagation and Adaptation of Seedlings Natanzi Pear (*Pyrus communis* cv. natanzi) with Mycorrhizal Infection

Hajisadeghian Najafabadi, Azimeh[1]; Roohollahi, Iman[2*]; Aghche kahrizi, zahra[3*]; Hashemi Baba heeydari, Seyd Abdollah[4]; Rezai Nodehi, Ayatolah[5]

[1] Horticulture Master of Science Student, Faculty of Agriculture, University of Shahed.

[2* and 5] Horticulture Department of Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Shahed

[3] The manager of Ati Gene Company

[4] Plant Protection Department of Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Shahed

[*]*Corresponding Author:* i.rohollahi@shahed.ac.ir

Abstract

Natanzi pear is one of the important commercially and Iranian high quality varieties from European pear. True to type plant can be produced with in vitro micro propagation. In this study propagation and rooting of seedling Natanzi pear in Murashige and Skoog (1962) medium were investigate under different level of growth regulators including benzyl adenine (BA) and indole-3-butyric acid (IBA) for proliferation and IBA for rooting stage. Also, influence of different bed and mycorrhizal fungi infection, were tested with the factorial experiment based on completely randomized design, to improve acclimatization of seedlings with ex vitro conditions. Most of the proliferation under BA and IBA (3 × 0.5 mg/L) treatment and most of the rooting percentage in two week darkness with 1.5 mg/L IBA were recorded. 100% of seedling were survived after acclimatization with mycorrhiza. The most phosphorus concentrations and root morphological characteristics was observed in peat moss with mycorrhiza fungi. In finally, BA and IBA and IBA only were recommend for Natanzi pear micro propagation, and rooting darkness treatment, respectively. Application of mycorrhiza fungi in peat moss bed were suitable to improve root characteristics, Acclimatization and seedling survival.

***Key words*: tissue culture, acclimatization, glomus mycorrhiza.**