بررسی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد بر پرآوری پنج رقم گلابی ابته‌فتل، درگزی، کوشیا، ملینا و اسپادونا

نوشین کاظمی *[۱]، فریبرز زارع نهندی[۲]، علی اکبر حبشی[۳]، محمدرضا دادپور[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، دانشگاه تبریز، تبریز

[۲] دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

[۳ و ۴] دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تبریز، تبریز

* نویسنده مسئول: *n.kazemi@tabrizu.ac.ir*

چکیده

در این پژوهش اثر تعدادی از تنظیم‌کننده‌های رشدی مانند BAP, 2IP, NAA, IAA و Zeatin در قالب ۷ تیمار هورمونی در محیط کشت پایه QL، بر میزان پرآوری شاخه در ۵ رقم گلابی به نام‌های ابته‌فتل، درگزی، کوشیا، ملینا و اسپادونا مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش یافتن محیط کشت بهینه تکثیر پنج رقم مورد مطالعه بود. نتایج این آزمایش نشان داد، تعداد ریزشاخه تولید شده از ریز نمونه‌های مورد بررسی، به‌طور معنی‌داری (P < ٪۱) تحت تأثیر رقم، ترکیبات محیط کشت و اثر متقابل این دو فاکتور بوده است. در بین تیمارها، بهترین محیط کشت T7 (BAP 1mg/l +Actiwave 300µl + Viva 300µl) با میانگین تولید ۴/۱۲ ریزشاخه بود. بنابراین تیمار هورمونی T7 به‌عنوان محیط بهینه، جهت تکثیر ریز نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: **پرآوری، گلابی، BAP، Zeatin، 2IP**

مقدمه

گلابی (Pyrus L.) میوه‌ای دانه‌دار، متعلق به خانواده رزاسه[۲] زیر خانواده مالوئیده[۳]، و جنس پیروس[۴] است و گونه‌های متعددی دارد (Silva et al., 2014). کورین و لپوئیور (۱۹۷۷) ترکیب نمک‌های معدنی QL[۵] را برای ریز ازدیادی گونه‌های مختلف درختان میوه خانواده گل‌سرخیان معرفی نمودند. آزمایشات پرویاتی و همکاران (۲۰۰۲) برتری محیط پایه QL را نسبت به محیط MS جهت ریز ازدیادی هیبریدهای گلابی نشان داد. لبلای و همکاران (Leblay et al., 1991) از نمک‌های معدنی QL تغییر یافته به‌منظور ریزازدیادی ارقام گلابی استفاده نمودند. کادوتا و نیمی (Kadota and Niimi, 2003) اثر سایتوکنین‌های مختلف روی ارقام گلابی ژاپنی متعلق به گونه P. pyrifolia را بررسی کردند و بالاترین میزان پرآوری را در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP[۶] مشاهده نمودند (Ruzic et al,. 2011). عبداللهی و همکاران (۲۰۰۶) در ریز ازدیادی ارقام گلابی به‌منظور استفاده در برنامه انتقال ژن، محیط رشدی مشتمل بر نمک‌های پایه QL تغییر یافته، غنی‌شده با ۳۰ گرم ساکارز، ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP ، ۱ میلی‌گرم در لیتر2ip و ۵ ٪۰/۰ پکتین خوشه انگور را توصیه نمودند. فریر و همکاران (Freire et al., 2002) در ریز ازدیادی گلابی روکا (Rocha) گزارش کردند که غلظت بالای BAP موجب افزایش تعداد شاخه‌ها شده و محیط QL در مقایسه با محیط MS موجب توسعه برگ ریز نمونه‌ها و افزایش وزن تر و خشک آن‌ها شده است. در محیط‌های کشت فاقد BAP میزان پرآوری شاخه در حد صفر باقی می‌ماند، همچنین در غیاب سایتوکنین هیچ شاخه زایی در گونه Pyrus calleryana Dcn. گزارش نشد(Berardi et al., 1993). استفاده از 2ip[۷] می‌تواند

۱- ترکیبات کودی آلی با قابلیت جذب از طریق ریشه و آوندهای چوبی، شامل ترکیبات میکرو وماکرو غذایی برای گیاهان، تولید شرکت Valagro، ایتالیا.

[1]. Rosaceae
[2]. Maloideae
[3]. Pyrus
[5]. Quoirin and lepoivre, 1977
[6]. 6-Benzylaminopurine
[7]. 2-isopentenyl adenine

منجر به تولید برگ‌های بزرگ‌تر شود، اما در صورت عدم وجود BA، منجر به کاهش جوانه‌های جانبی می‌شود (Bell, 1995,; Moretti et al.,1992).

مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی گیاهچه‌های کشت بافتی از پنج رقم گلابی (تهیه شده در فصل بهار از سرشاخه‌های در حال رشد، ایستگاه تحقیقاتی کمال شهر) شامل: ابته فتل (Abate Fetal)، درگزی (Dargazi)، کوشیا (Coscia)، ملینا (Mellina) و اسپادونا (Spadona) در پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران صورت قرار گرفت. با توجه به تفاوت در ارقام مورد بررسی و جهت دستیابی به مناسب‌ترین و سریع‌ترین روش تکثیر و افزایش ریز نمونه‌های گیاهی، ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مانند بنزیل آمینوپورین (BAP)، زآتین ریبوزاید (Zeatinriboside) و ۲-ایزوپنتنیل آدنین (2-ip) و اکسین‌هایی مانند نفتالین استیک اسید (NAA) و ایندول استیک اسید (IAA[8]) در محیط کشت QL (Quoirin M. and P. Lepoivre.1977) به شرح زیر مورد مقایسه قرار گرفتند.

۱) T1: BAP 1mg/l + IAA 0.2mg/l + 2ip 1mg/l؛ ۲) T2: BAP1mg/l؛ ۳) T3: BAP 1mg/l + NAA 0.05mg/l؛ ۴) T4: BAP 1mg/l + NAA 0.1mg/l + 2ip 1mg/l؛ ۵) T5: BAP 1mg/l + NAA 0.05mg/l + 2ip 1mg/l؛ ۶) T6: BAP 1mg/l + Zeatin 1mg/l + 2ip1mg/l؛ ۷) T7: BAP 1mg/l + Actiwave 300µl + Viva 300µl[9]

تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط پایه QL به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز به‌عنوان منبع کربوهیدرات و ۶/۸ گرم در لیتر آگار جهت جامد کردن محیط کشت مورد بررسی قرار گرفتند. در هر ظرف کشت (شیشه‌هایی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۷ سانتی‌متر) ۵ ریزنمونه با طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر کشت شد و در محیطی با میزان نور ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای محیط ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۸ هفته، قرار داده شدند. پس از پایان آزمایش، صفات رشد رویشی و میزان پرآوری ریزنمونه‌های هر رقم بررسی شد. هدف از انجام این پژوهش، بهینه‌سازی محیط کشت پرآوری ارقام مورد بررسی بود.

نتایج و بحث

نتایج این آزمایش نشان داد، تعداد ریزشاخه تولید شده از ریز نمونه‌های مورد بررسی، به‌طور معنی‌داری ($P < ٪۱$) تحت تأثیر رقم، ترکیبات محیط کشت و اثر متقابل این دو فاکتور بوده است.

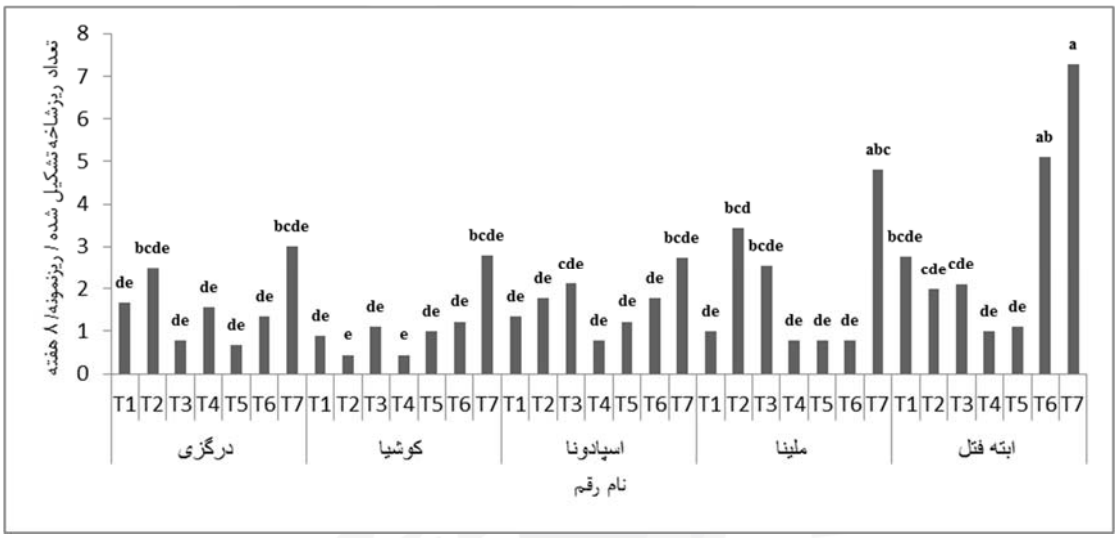
مقایسه میانگین تعداد ریز شاخه‌ی تشکیل شده از ارقام مختلف در ترکیبات مختلف تنظیم‌کننده رشدی نشان داد، بیشترین میانگین تعداد شاخه (۷/۲۶ شاخه/ریزنمونه/۸ هفته) از ریزنمونه‌های رقم ابته‌فتل و در محیط کشت T7 به‌دست آمده است، و کمترین تعداد شاخه جدید نیز از ریزنمونه‌های رقم کوشیا در محیط کشت‌های T2 و T4 (۰/۴۴ شاخه/ریزنمونه/۸هفته) مشاهده شد (شکل ۱). این امر می‌تواند ناشی از پتانسیل متفاوت ارقام مختلف گلابی در تولید ریزشاخه و سطح پایه متفاوت در نسبت هورمون‌های داخلی هر رقم و یا امکان تولید مریستم نابجا یا مریستموئید در برخی از ارقام باشد. موارد مذکور می‌تواند واکنش و پاسخ‌دهی متفاوتی در هر رقم نسبت به ترکیبات اضافه شده در محیط کشت ایجاد نماید که در نهایت منجر به تفاوت در محیط بهینه مورد نیاز برای تکثیر هر رقم می‌گردد. وجود تفاوت در ظرفیت شاخه‌زایی ارقام مختلف گلابی در واکنش به ترکیبات موجود در محیط کشت، در تحقیقات گذشته نیز اعلام شده است (Safarpoor et al., 2008; Antunes de MLK et al,. Rehman HU 2015; Iglesias et al., 2004; Thakur A ؛Shorbakhlo et al., 2008 .(2004; Hamant and Traas, 2010;

در بین ریزنمونه‌های مورد بررسی، بهترین قابلیت تولید ریز شاخه در رقم ابته فتل (۳/۰۵) وجود داشت و کمترین عملکرد در این زمینه در رقم کوشیا (۱/۱۲) مشاهده شد. بهترین تیمار محیط کشت از نظر میانگین تولید ریز شاخه محیط

[8] . Indole-3-acetic acid

۹- ترکیبات کودی آلی با قابلیت جذب از طریق ریشه و آوندهای چوبی، شامل ترکیبات میکرو وماکرو غذایی برای گیاهان، تولید شرکت Valagro، ایتالیا.

T7 (۴/۱۲) بود و ضعیف‌ترین ترکیب تنظیم‌کننده‌ی رشدی در این زمینه تیمارهای T4 (۰/۹۰) و T5 (۰/۹۵) بودند. به‌طورکلی، تنظیم‌کننده‌های رشد به کار رفته در محیط کشت، اثر قابل ملاحظه‌ای بر توان باززایی شاخه و در کل کنترل صفات رشد رویشی ریزنمونه‌های ارقام مختلف گلابی داشتند و در بین آن‌ها، تیمار T7 بهترین تیمار شناخته شد. این تیمار تنها با داشتن یک نوع سایتوکنین (BAP) بدون افزودن ترکیبات اکسینی، بالاترین عملکرد رشد رویشی و پرآوری را در ارقام مورد بررسی ایجاد کرد. بیشتر پژوهشگران در زمینه گلابی نیز، از بنزیل آمینوپورین به‌عنوان یک سایتوکینین کلیدی جهت تحریک شاخه‌زایی در ریزازدیادی گلابی استفاده نموده‌اند (Hu and wang 1983; Moretti et al., 1991؛ Thakure et al., 2008).



شکل ۱- اثر متقابل رقم و تیمارهای تنظیم‌کننده رشدی بر تعداد ریز شاخه تولید شده در هر ریزنمونه

به نظر می‌رسد BAP با افزایش تحریک تقسیم و رشد جوانه‌های جانبی و کاهش اثر غالبیت انتهایی در ریز نمونه‌ها باعث افزایش باززایی شاخه از ریز نمونه‌ها می‌شود (Taji et al., 1997). در بسیاری از پژوهش‌ها از سایتوکنین‌های زآتین و 2ip نیز استفاده شده است (Bell & Reed, 2002) مثلاً در تکثیر کولتیوارهای Williams وMax Red Bartlett استفاده از ۲ میلی‌گرم در لیتر 2ip باعث بهبود پرآوری شده (Moretti et al. 1992)، اما این سایتوکنین‌ها به‌ندرت در پژوهش‌ها به‌عنوان محرک باززایی ریز شاخه‌های گلابی به کار گرفته شده‌اند. زآتین و 2ip معمولاً به‌صورت مکمل BAP در محیط کشت اضافه می‌گردند (Shen and Mullins, 1984)، اما در عدم حضور BAP می‌توانند عامل کاهش تولید ریز شاخه‌های جدید باشند (Bell, 1995, 2009; Moretti et al., 1992) که این امر همسویی زیادی با تحقیق حاضر نداشت، به این دلیل که در ارقام مورد بررسی این پژوهش، محیط کشت‌های حاوی زآتین و 2ip حتی در حضور BAP نیز باعث کاهش عملکرد پرآوری شدند. در تحقیقی آمده است، عمده‌ترین ترکیب تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده در کشت درون شیشه‌ای گلابی، ۱ میلی‌گرم در لیترBA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA یا NAA بوده است (Shibli et al., 1997) و در کل اکسین‌هایی مانند IBA (۰/۵ میکرومولار) و یا NAA (۰/۰۵ تا ۰/۵ میکرومولار) اغلب همراه BAP استفاده می‌شوند. در پژوهشی دیگر آمده است وجود غلظت‌های بیشتر از ۰/۵ میکرومولار IBA و یا غلظت بیشتر ۱ میکرومولار NAA باعث کاهش پرآوری ارقام P. calleryana, P. betulifolia, and P. com- munis گلابی می‌شود Yeo and Reed (1995) و در تحقیقی دیگر نشان داده شد میزان پرآوری رقم P. elaeagrifolia در حضور ۰/۵ میکرومولار IAA بسیار مطلوب بوده است (Ahmet, A. et al 2015). نتایج به‌دست‌آمده در بهینه‌سازی پرآوری پنج رقم گلابی مورد مطالعه در این پژوهش، با موارد مذکور همسو نبود، زیرا در غلظت‌های بسیار کمتر از موارد ذکر شده، با کاهش باززایی شاخه در مقایسه با نبود این هورمون‌ها مواجه شدیم و در کل اثر مطلوبی در فرآیند پرآوری نداشتند. و همان‌طور که ذکر شد تعداد زیادی از پژوهشگران بدون کاربرد اکسین نتیجه مطلوبی به دست آورده‌اند (Shen and Mullins 1984).

منابع

Abdollahi, H., Muleo, R. and Rugini, E. 2006. Optimization of regeneration andmaintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. Sci.Hortic, 108: 352-358.

Ahmet, A. and Hatice, D. 2015. Invitro shoot proliferation and invitro and ex vitro root formation of *Pyrus elaeagrifolia* Pallas. Front Plant Sci, Volume 6 , Article 225.

Antunes de, M.L.K., Claudia, F., Leandro, C. and Lima da, S.A. 2004. In vitro establishment and multiplication of *Pyrus calleryana* D-6 on doublephase culture system. Brazil Mag Fruit Cult, 26: 403 405.

Bell, R.L. 1995. Preconditioning effects of proliferation medium on adventitious regeneration of pear. HortSci, 30:832.

Bell, R. L. and Reed, B. M. 2002. In vitro tissue culture of pear: advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation. Acta Hortic,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 Cell Dev Biol Plant, 45: 708-714.

Berardi, G., Infant, R. and Neri, D. 1993. Microporopagation of *Pyrus calleryana* Dcn. From seedlings, Sci Hortic, 53: 157-165.

Freire, I. C. G., Oelho, C. P. S. C. and Barros, M. T. F. 2002. Improved culture media for the in vitro establishment of pear from nodal cuttings. Acta Hortic, 569: 457- 461.

Hamant, O. and Traas, J. 2010. The mechanics behind plant development. New Phytol, 185: 369–385.

Hu, C.Y. and Wang, P.J. 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Culture. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammiratoo and Yamada (eds) Handbook of Plant Cell Culture Vol. l, MacMillan, New York, PP: 177-227.

Iglesias, I., Vilardell, P., Bonany, J., Claveria, E. and Dolcet-Sanjuan, R. 2004. Micropropagation and field evaluation of thep ear (*Pyrus communis* L.) "IGE 2002," a new selection of the cultivar Dr.JulesGuyot. Am Soc Hort Sci, 129, 389–393.

Kadota, M. and Niimi, Y. 2003. Effects of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss Organ Cult, 72: 261-265.

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

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

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

Previati, A., Darei, F., Bassi, D., Tagliavini, M., and Marangoni, B. 2002. Development of protocols for in vitro propagation of advanced selections of *Pyrus communis* rootstocks 69BIS. Acta Hortic, 596: 505-508.

Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Improved medium for in vitro culture of *Prunus sp*. Acta Hortic, 78:437-442.

Rehman, H.U. 2015. In vitro Propagation of Kainth (*Pyrus pashia*) Using Explants from Forced Cutting. J Horticulture, 2: 127.

Ruzic, D.J., Vujovic, T., Nikolic, D. and Cerovic, R. 2011. In vitro growth responses of the 'Pyrodwarf' pear rootstock to cytokinin types. Roman. Biotech Lett, 16: 6630-6637.

Safarpoor Shorbakhlo, M.., Bahar, M., Tabatabee, B.E.S. and Abdollahi, H. 2008. Determination of genetic diversity in pear (*Pyrus spp*.) using microsatellite markers. Hortic Sci and Tech, 9: 113-128.

Shen, X.S. and Mullins, M. G. 1984. Propagation in vitro of pear, *Pyrus communis* L. cultivars 'William's Bon Chretien', 'Packham's Triumph', and 'Beurré Bosc'. Sci Hortic, 23:51-57.

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

Silva, G. J., Souza, T. M., Barbieri, R. L. and de Oliveira, A. C. 2014. Origin, Domestication, and Dispersing of Pear (Pyrus spp.). Advances in Agriculture, 9: 1-8.

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 Organ Cult, 99: 299- 304.

Thakure, A. and Dalal RPS, N. 2008. Micropropagation of pear (*Pyrus spp*.). A review. Agric Rev, 29(4): 260-270.

Yeo, D.Y. and Reed, B.M. 1995. Micropropagation of three *Pyrus* rootstocks. HortScience, 30: 620–623.

The Effect of Growth Regulators on Proliferation of Five Pear Cultivars: Abate Fetel, Dargazi, Coscia, Mellina and Spadona

Nooshin Kazemi [1 *], Fariborz Zaree Nahandi [2], Ali Akbar Habashi [3] Mohammad Reza Dadpour [4]

[1, 2, 4] Dept. of Horticultural Sciences University of Tabriz, Tabriz
[3] Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj
Corresponding Author: n.kazemi@tabrizu.ac.ir

Abstract

In this study, the effect of growth regulators such as BAP, 2IP, NAA, IAA and Zeatin on the proliferation of five pear cultivars: Abate Fetel, Dargazi, Coscia, Mellina and Spadona were studied in 7 hormonal treatments in QL medium to optimization prolifration medium of pear.The results showed that the number of shoots proliferation, significantly (P < %1) influenced by cultivar, medium composition and interaction effect between these two factors. The best treatment in quantitative and qualitative characteristics of proliferation for five under studied pear cultivars, was T7 (BAP 1mg/l + Actiwave 300µl + Viva 300µl) with average of 4.12 shoot multiplication. So the T7 treatment was used as optimizing media for the proliferation of explants.

***Keywords*: proliferation, pear, BAP, Zeatin, 2IP**