علوم باغبانی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۵ (ص ۱۴۴-۱۳۵) DOI: 10.22059/ijhs.2016.58219

بررسی ریزازدیادی درون شیشه‌ای برخی از رقم‌های امیدبخش 'به' (*Cydonia oblonga* Mill.)

فرشته خسروی‌نژاد[۱]، حمید عبداللهی[۲*]، بهاره کاشفی[۳]، مریم حسنی[٤] و زینب صالحی[٥]

۱ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکدۀ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، ایران

۲ و ۵. دانشیار و کارشناس ارشد بخش تحقیقات باغبانی، مؤسسۀ تحقیقات اصلاح و تهیۀ نهال و بذر، کرج، ایران

٤. کارشناس ارشد، دانشکدۀ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/٤/۱۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۹)

چکیده

در بین درختان میوۀ دانه‌دار، درخت 'به' حساس‌ترین میزبان بیماری آتشک بوده و گزینش رقم‌های متحمل آن اهمیت دارد. در این تحقیق برای تعیین شرایط بهینۀ افزایش، ریز نمونه‌های رقم‌های امیدبخش KVD4، NB2، PH2 به همراه پایۀ کوئینس C و رقم شاهد اصفهان (KVD3) در محیط‌های MS، QL و QL تغییریافته (mQL)، ارزیابی و بیشترین میزان رشد در کمترین زمان و بهترین پرآوری در mQL مشاهده شد. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف دو هورمون گیاهی سایتوکینین 2iP و BAP در محیط پایۀ mQL، به ترتیب برتری محیط حاوی ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2iP و BAP با بهترین شمار و کیفیت ریز شاخه‌ها مشخص شد. ریشه‌زایی شاخساره‌ها در تیمار درازمدت با غلظت‌های ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA و تأثیر توأم IBA وBAP با غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار کوتاه‌مدت با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA، مشخص کرد که تیمار کوتاه‌مدت، ریشه‌زایی بهتری دارد. بیشترین درصد ریشه‌زایی، توسعۀ برگی، طول و کیفیت ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار کوتاه‌مدت ایجاد شد. به‌طورکلی برای ریزازدیادی رقم‌ها و بقاء مطلوب ریز شاخه‌ها، محیط رشدی مشتمل بر نمک‌های پایۀ mQL غنی‌شده با ۳ درصد ساکارز، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2iP، ۰/۵ درصد پکتین و ۰/٦ درصد آگار توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنظیم‌کننده‌های رشد، ریز نمونه، ریشه‌زایی، سایتوکینین، محیط کشت.

مقدمه

درخت به با نام علمی *Cydonia oblonga* Mill. متعلق به تیرۀ گل‌سرخیان[۱] و زیر تیرۀ سیب‌سانان[۲] است که با پایۀ کروموزومی X=17 و به‌صورت دولاد یا دیپلوئید (2n=2x=34) در گروه میوه‌های دانه‌دار مناطق معتدله قرار دارد (Bakhriddinov, 1985). خاستگاه این‌گونه جنوب شرقی اروپا، آسیای صغیر، مناطقی از شمال و غرب ایران، ترکمنستان و قفقاز است (Vavilov, 1930). در ایران به دلیل ارزش اقتصادی، پرورش به از دیرباز موردتوجه قرارگرفته و تاکنون ژنوتیپ‌های وحشی و گزینش‌شدۀ محلی به‌عنوان رقم‌های بومی مورد کشت‌وکار قرارگرفته‌اند (Manee, 1994). به‌رغم

* تلفن: ۰۹۱۲۶۱۰۳۱۱۵
E-mail: HamidAbdollahi@spii.ir

1. Rosaceae
2. Pomoideae

تفاوت ظاهری اندک رقم‌های تجاری به در مقایسه با دیگر درختان دانه‌دار، رقم‌هایی مانند اورنج (Orange)، وان‌دمان (Van Deman)، پاین اپل (Pineapple)، لیمون (Limon) و اسمیرنا (Smyrna) از این محصول در سطح جهان شناخته و معرفی شده‌اند (USDA-ARS-GREEN, 2011). بنابر آمار منتشره توسط سازمان خواروبار و کشاورزی (فائو)، ایران ازنظر سطح زیر کشت، رتبهٔ چهارم (۵/۲ هزار هکتار) و ازنظر تولید این محصول رتبهٔ پنجم (۳۵ هزار تن) جهانی را به خود اختصاص داده است (FAO, 2012).

با توجه به پیشرفت‌های اخیر درزمینهٔ کشت بافت، افزونش انبوه درختان میوهٔ دانه‌دار ازجمله گلابی (Rozban *et al*., 2002) و سیب (Bahmani *et al*., 2009) به صورت هم‌گروه با ریزازدیادی[1] در کمترین زمان و فضای ممکن توجیه اقتصادی داشته و وسیله‌ای کارا برای افزایش رقم‌های اصلاح‌شده و یا رقم‌های حاصل از روش‌های زیست‌فناوری[2] به‌شمار می‌آید. باوجود انجام تحقیقات بسیار در زمینهٔ کشت بافت درختان میوهٔ دانه‌دار در جهان، اما تاکنون استفاده از روش‌های کشت بافت باهدف ریزازدیادی و افزایش رویشی رقم‌ها و پایه‌های مختلف درخت به چندان مدنظر نبوده است که شاید مهم‌ترین دلیل آن، آسانی ریشه‌زا بودن این‌گونه در مقایسه با بسیاری از دیگر درختان میوه باشد. بررسی‌های اولیه درزمینهٔ بدون ویروس کردن، کاربرد کشت بافت و افزایش درخت به توسط Nemeth (1979)، Druart (1980) و Al Maarri *et al*. (1986) گزارش شده است. از نخستین بررسی‌های انجام‌گرفته در رابطه با افزایش درون شیشه‌ای پرونس کوئینس (Provence Quince) می‌توان به بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف ۶-بنزیل‌آمینوپورین[3] (BAP) روی پرآوری[4] و میزان طویل شدن شاخه‌چه‌های گیاه به و همچنین انتخاب بهترین شرایط ریشه‌زایی ریز قلمه‌ها[5] اشاره کرد (Al Maarri *et al*., 1986). افزون بر استفاده از کشت بافت، به‌عنوان روشی برای افزایش انبوه درخت به، گزینش رقم‌های و ژنوتیپ‌های متحمل به انواع تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده نیز موردنظر قرار گرفته است. Vitagliano *et al*. (1992) رقم‌های متحمل‌تر این گونه را نسبت به نمک (NaCl) در شرایط درون شیشه بررسی کردند. مطالعهٔ دیگر توسط Chartier-Hollis (1993)، ضرورت تأثیر اسید جیبرلیک[6] (GA) را در تحریک رشد و نگهداری از پینهٔ (کالوس) درخت 'به' نشان داد. در تحقیقات Gulsen *et al*. (1999)، با بررسی و مقایسهٔ آگارهای مختلف روی پرآوری شاخه‌چه‌های درون شیشهٔ پایهٔ به کوئینس A (Quince-A)، آگار مرک (Merck) بهتر از دیگران تشخیص داده شد و همچنین ژلرایت (Gelrite) با توجه به‌سختی آن با کمترین مطلوبیت برای پرآوری 'به'معرفی شد. همچنین Gulsen *et al*. (1999) بررسی خود را روی انتخاب بهترین غلظت محیط کشت MS[7] برای ریشه‌زایی ریز قلمه‌های 'به' معطوف کردند. در پژوهشی که توسط D'Onofrio and Morini (2005) با هدف باززرائی ریزنمونه‌های 'به' با استفاده از سایتوکینین‌های[8] مختلف انجام گرفت، نشان داده شد که BAP کارآئی کمتری در مقایسه با TDZ به‌منظور تحریک تولید جوانه‌های نابجا دارد. بررسی‌های اخیر گویای بررسی تأثیر نمک‌های مختلف محیط‌های کشت شامل WPM[9] و QL[10] روی رشد و پرآوری پایه‌ها و رقم‌های به توسط Giorgota *et al*. (2009) بوده است. با توجه به این نکته که کشت بافت و افزایش درون شیشه‌ای، امکان استفاده از پایه‌های موردنیاز 'به' را در همهٔ طول سال در خزانه میسر می‌سازد و موجب افزایش سریع‌تر رقم‌ها و پایه‌های متحمل به آتشک در درخت 'به' می‌شود بهینه‌سازی روش‌های افزایش درون شیشه، سبب تسریع افزایش رقم‌ها و پایه‌های موردنظر خواهد شد.

1. Micropropagation
2. Biotechnology
3. 6-Benzylaminopurine
4. Proliferation
5. Micro-cuttings
6. Gibberellic Acid (GA)
7. Murashige and Skoog (MS)
8. *Cytokinin*s
9. Woody Plant Medium (WPM)
10. Quoirin and Lepoivre (QL)

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد آزمایش

برای انجام آزمایش، از قطعه‌های گره‌ای[1] رقم‌های امیدبخش به شامل KVD4، NB2، PH2 به همراه پایهٔ کوئینس C و رقم اصفهان (KVD3) به‌عنوان مواد گیاهی شاهد که در بخش تحقیقات باغبانی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج به‌صورت گیاهچه‌های بدون ویروس در محیط درون شیشه قرار داشتند، بهره گرفته شد. شرایط ریزازدیادی طی چندین مرحله و در قالب آزمایش‌هایی جداگانه بهینه شد و بهترین نتیجه از هر مرحله، در آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

ارزیابی تأثیر محیط‌های پایهٔ رشد

بررسی و تعیین بهترین محیط پایهٔ رشد برای رقم‌های مورد آزمایش، در پنج تکرار و سه سطح محیط کشت مختلف شامل MS (Murashige & Skoog, 1962)، QL (Quoirin & Lepoivre, 1977) و QL تغییریافته[2] (Leblay *et al*, 1991) که به ترتیب حاوی ۲/۹، ۵/۱ و ۶/۴ میلی‌مول کلسیم؛ ۲۰/۶، ۵ و ۷/۵ میلی‌مول آمونیوم؛ ۳۹/۴، ۳۳ و ۳۷/۶ میلی‌مول نیترات همراه با غلظت‌های مختلف BAP بودند، به اجرا درآمد. افزون بر این، محیط MS با میواینوزیتول، گلایسین، نیکوتینیک اسید، پیرودوکسین و تیامین به ترتیب با میزان ۱۰۰، ۲، ۰/۵، ۰/۵، و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر و دیگر محیط‌ها با ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر میواینوزیتول و ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر تیامین، ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز و ۰/۳ گرم بر لیتر پکتین غنی شدند و پس از تنظیم اسیدیتهٔ محیط‌ها روی ۵/۷ و افزودن ۷/۳ گرم آگار، در دمای ۱۲۰ درجهٔ سلسیوس با فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه توسط اتوکلاو سترون شدند. سپس ۳۰ میلی‌لیتر از هر محیط، به شیشه‌های کشت انتقال یافت و پنج ریز نمونه در آن کشت شد. شیشه‌های حاوی ریز نمونه، تحت شرایط دورهٔ نوری (فتوپریود) ۱۶ ساعت نور ایجادشده توسط لامپ‌های فلئورسنت سفید (Sylvania-Germany) با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۲۳ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. درنهایت صفات رویشی رقم‌های شامل شمار شاخه، طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)، شمار برگ، توسعهٔ سطح برگ (میلی‌متر مربع)، طول میانگره (میلی‌متر) و میزان بافت‌مردگی (نکروز) انتهائی شاخه‌چه‌ها در دوره‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵ روز پس از واکشت[3] اندازه‌گیری شد. لازم به یادآوری است که واکشت اول تنها برای سازگاری با محیط جدید انجام شد و نتایج نهایی آزمایش پس از دو دورهٔ واکشت، یادداشت‌برداری شد.

ارزیابی تأثیر سایتوکینین‌های 2ip و BAP

به‌منظور بهبود بیشتر محیط ریزازدیادی رقم‌های امیدبخش به، اثر سایتوکینین‌های 2ip[4] و BAP، هرکدام در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر ارزیابی شد. همهٔ محیط‌های پایهٔ مورداستفاده در این مرحله با نمک‌های کانی mQL و ویتامین‌های QL، غنی شد و دیگر مراحل برابر با شرایط آزمون بهترین محیط پایه انجام پذیرفت.

ارزیابی توان ریشه‌زایی

در ادامهٔ تحقیق از ریز شاخه‌های ریزازدیادی‌شده روی محیط mQL به‌عنوان ریز قلمه برای آزمون ریشه‌زایی[5] استفاده شد و ریز شاخه‌هایی با میانگین طول ۳ سانتی‌متر به دو روش زیر در تیمار ریشه‌زایی قرار گرفتند: الف) تیمار درازمدت در حالت اول با ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر اسید ایندول بوتیریک[6] (IBA) و در حالت دوم با ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP. ب) تیمار کوتاه‌مدت با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA (Abdollahi *et al*., 2006; Khodaee Chegenee *et al*., 2011). هر دو نوع محیط ریشه‌زایی نمک‌های mQL، غنی‌شده با ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۷/۳ گرم بر لیتر آگار و ۰/۳ گرم بر لیتر پکتین داشتند. در تیمار درازمدت، ریز نمونه‌ها پس از انتقال به محیط کشت به

1. Nodal segments
2. modified Quoirin and Lepoivre (mQL)
3. Subculture
4. 2-isopentenyladenine
5. Rooting Test
6. Indole-3-Butyric Acid

مدت ده روز در تاریکی مطلق نگهداری شدند و سپس روی همان محیط به مدت دو ماه بدون واکشت در شرایط دورهٔ نوری ۱۶ ساعت نور قرار گرفتند. در تیمار کوتاه‌مدت، ریز قلمه‌ها به مدت ده روز در تاریکی مطلق در حضور غلظت‌های مختلف IBA نگهداری شدند و سپس به محیط بدون تنظیم‌کنندهٔ رشد حاوی ۳ درصد ساکارز، ۷/۳ گرم بر لیتر آگار و ۰/۳ گرم بر لیتر پکتین منتقل و برابر با شرایط نوری و دمایی مرحلهٔ پرآوری به مدت دو ماه بدون واکشت نگهداری شدند. انجام آزمایش با عامل رقم‌های به در پنج سطح و با عامل ریشه‌زایی در پنج سطح با پنج تکرار اجرا شد. سپس درصد ریشه‌زایی، میانگین شمار ریشه به ازا هر ریز قلمه، کیفیت ریشه، طول ریشه (میلی‌متر) و کیفیت ساقه ریز نمونه با مقیاس عددی (به‌صورت ۱: بسیار خوب، ۲: خوب، ۳: متوسط، ۴: بد، ۵: بسیار بد)، پس از دو ماه تعیین شد. تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر محیط‌های پایه

تجزیهٔ واریانس داده‌ها بیانگر تأثیر معنی‌دار تأثیر محیط‌های رشد روی صفات شمار شاخهٔ پرآوری‌شده و طول شاخه‌چه‌ها بود. در بررسی محیط‌های پایهٔ رشد رقم‌های KVD4، NB2، PH2، رقم شاهد KVD3 و پایهٔ کوئینس C مشخص شد که محیط‌های mQL، QL و MS به ترتیب بهترین واکنش رشد و پرآوری نسبت به زمان را داشتند. بر این پایه بیشترین میانگین طول ساقه‌چه‌های رقم‌های به با میانگین۵/۲۲ که به محیط mQL تعلق داشت، اختلاف معنی‌داری با طول شاخه‌چه‌های رقم‌ها در محیط‌های کشت MS نداشت (جدول ۱). با اندازه‌گیری طول ساقه‌چهٔ رقم‌ها در محیط‌های کشت، پایهٔ کوئینس C با کمترین طول ساقه‌چه نشان داد که نوع محیط، اختلاف معنی‌داری را در این پایه باعث نمی‌شود و این مسئله نشانگر ارتباط میزان رشد درون شیشهٔ آن با شدت پاکوتاهی این پایه در شرایط باغ است. نتایج همسانی برای رقم‌های NB2 و PH2، با طول ساقه‌چهٔ بلندتر نسبت به پایهٔ کوئینس C، مشاهده شد درصورتی‌که بیشترین میزان طول ساقه‌چه برای رقم‌های KVD3 و KVD4 در محیط mQL مشاهده شد (شکل ۱-A).

بررسی تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر محیط‌های کشت بر میزان پرآوری در محیط درون شیشه، گویای اختلافی معنی‌دار در سطح ۵ درصد بود در حالی‌که تأثیر محیط روی رقم‌ها، معنی‌دار نبود. باوجود تأثیر و برتری محیط mQL ازنظر شمار شاخه با میانگین ۱۲/۳۰ نسبت به دو محیط دیگر، پایین‌ترین شمار شاخه با میانگین۷/۵۰ به محیط MS تعلق داشت و محیط QL قادر به افزایش رقم‌هایی با شمار شاخه‌هایی با میانگین ۹/۴۳ شد (جدول ۱). این بررسی با تحقیقات DePaoli *et al.* (1994) که افزون بر طراحی محیط پایهٔ QL در ریزازدیادی گونه‌های درختان میوه، تأثیر آن را روی گونهٔ گلابی با بیشترین مطلوبیت معرفی کردند، سازگار بود. برابر با آنچه در شکل ۱-B مشاهده می‌شود، پایهٔ کوئینس C بهترین بازدهٔ پرآوری نسبت به دیگر رقم‌ها در هر سه محیط کشت را داشت که ضمن معنی‌دار نبودن اثر متقابل محیط و رقم، تأثیر محیط کشت mQL در آن به‌روشنی قابل مشاهده است. لیکن در نقطهٔ مقابل آن، رقم NB2 در هر سه محیط با کمترین میزان پرآوری قرار داشت که نشان می‌دهد افزایش در شرایط درون شیشه به‌سختی و در مدت‌زمان بیشتری نسبت به دیگر رقم‌ها انجام یافته است. ویژگی مشترک این رقم با دیگر رقم‌ها در تشکیل شمار شاخه‌های بالاتر در محیط mQL مغایرت آن را با گزارش Bell (1995) مبنی بر این‌که QL بهترین محیط برای افزایش شمار شاخه‌های گلابی است بیان می‌کند. همچنین این نتیجه، با بررسی Giorgota *et al.* (2009) که به‌رغم وجود درصدی عارضه شیشه‌ای شدن[1] در ریز شاخه‌های درون شیشهٔ به، کارایی محیط QL را روی رشد و پرآوری پایه‌ها و رقم‌های به، بسیار بهتر از محیط WPM نشان دادند، موافق نبود (Lloyd & McCown, 1980).

1. Hyperhydratation

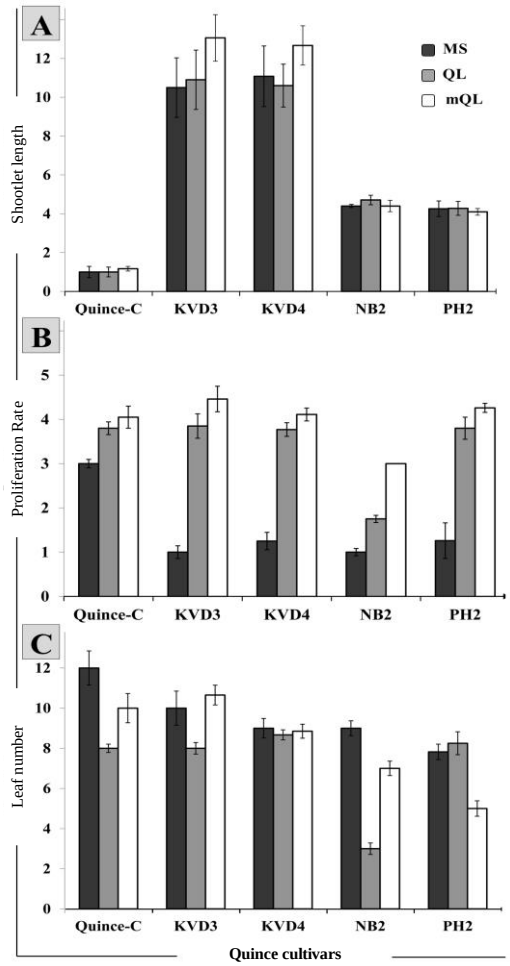
جدول ۱. تأثیر محیط‌های کشت MS، QL و mQL بر صفات رویشی رقم‌های به در شرایط درون شیشه

Table 1. Effect of MS, QL and mQL growth media on vegetative characteristics of quince cultivars in *in vit*ro conditions

Growth media	Necrosis	Internode length	Leaf expansion	Node number	Shootlet length	Shootlet number
	%	mm	mm^2	--	cm	--
MS	0.04 b	0.40 a	41.60 a	12.70 a	5.20 a	7.50 c
QL	0.09 a	0.52 a	40.78 a	7.70 c	4.43 b	9.43 b
mQL	0.03 b	0.70 a	40.30 a	9.60 b	5.22 a	12.30 a

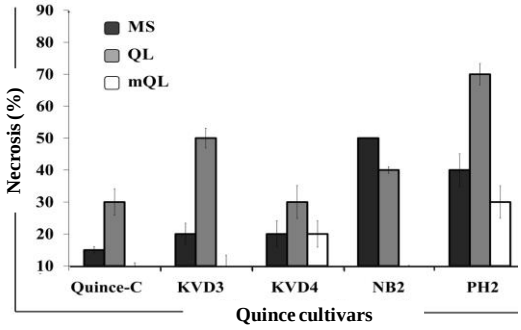
بر پایهٔ مقایسهٔ میانگین شمار گره نیز مشخص شد که اختلاف معنی‌داری بین شمار گره و برگ در سه محیط کشت موردبررسی وجود ندارد. برابر نتایج جدول ۱، محیط‌های MS با میانگین ۱۲/۷۰ و QL با میانگین ۷/۷۰ به ترتیب بیشترین و کمترین شمار برگ را داشتند. به‌جز رقم KVD4 که در آن تفاوتی ازنظر شمار گره روی همهٔ محیط‌های کشت مورداستفاده مشاهده نشد، اختلاف شمار گره‌ها در دیگر رقم‌ها با سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. بر این پایه بیشترین شمار گره متعلق به پایهٔ کوئینس C در محیط MS و کمترین شمار گره متعلق به رقم NB2 در محیط QL مشاهده شد و برای رقم PH2 برخلاف رقم‌های دیگر، کمترین شمار گره در mQL و بیشترین شمار گره در QL به دست آمد (شکل ۱-C). اندازه‌گیری سطح برگ در این آزمایش به مفهوم داشتن برگ‌های طبیعی و تکامل‌یافته، اختلاف معنی‌داری بین سه محیط نشان نداد. محیط MS ازلحاظ توسعهٔ برگ‌ها با بیشترین میانگین (۴۱/۶۰میلی‌مترمربع) و ازلحاظ طول میانگره با کمترین میانگین (۰/۴میلی‌متر) امتیازبندی شد (جدول ۱).

با توجه به اینکه در ریزازدیادی گونه‌های چوبی، قهوه‌ای شدن (بافت‌مردگی) ریز نمونه‌ها یکی از چالش‌های عمدهٔ کشت‌های درون شیشه‌ای است (Pierik, 1997)، در به نیز میزان بافت‌مردگی در دستیابی موفقیت یا بدون موفقیت ریزازدیادی آن نقشی تعیین‌کننده‌ای دارد. در این بررسی، بیشترین میزان بافت‌مردگی در محیط کشت QL با ۰/۰۹ درصد و کمترین میزان آن در محیط‌های کشت MS (۰/۰۴ درصد) و mQL (۰/۰۳ درصد) رخ داد (جدول۲) که در مشاهده‌های بافت‌مردگی برای همهٔ رقم‌ها هم، محیط mQL با کمترین میزان بافت‌مردگی به چشم می‌خورد. پایهٔ کوئینس C با پایین‌ترین میزان قهوه‌ای شدن ریز نمونه‌های درون شیشه در دو محیط MS و mQL در مقابل رقم PH2 با بالاترین میزان بافت‌مردگی در محیط QL، مقاوم‌ترین نمونه در زمینهٔ بافت‌مردگی نسبت به رقم‌های دیگر شناخته شد (شکل۲).



شکل۱. تأثیر محیط‌های کشت مختلف بر ویژگی‌های رویشی رقم‌های به در شرایط درون شیشه شامل A) طول ساقه‌چه، B) پرآوری، C) شمار برگ

Figure 1. Effect of various growth media on vegetative characteristics of quince cultivars in *in vitro* condition, including: A) Shootlet length, B) Proliferation rate, C) Leaf number.



شکل۲. تأثیر محیط‌های کشت مختلف بر میزان بافت‌مردگی در رقم‌های مورد آزمایش به در شرایط درون شیشه

Figure 2. Effect of various growth media on the necrosis of quince cultivars in *in vitro* conditions

به‌رغم نامشخص بودن علت اصلی بافت‌مردگی جوانه‌های انتهایی در محیط درون شیشه، کاهش کلسیم در محیط کشت به‌عنوان عاملی مؤثر به‌شمار می‌رود (Ye *et al*., 2000). مقایسهٔ تأثیر و عملکرد نمک‌های کانی محیط‌های کشت در این تحقیق هم با افزایش سطح کلسیم در محیط پایهٔ mQL همراه بود، درحالی‌که سطوح آمونیوم در محیط پایهٔ QL نسبت به محیط MS کمتر و در محیط پایهٔ mQL نسبت به محیط QL بیشتر بود. این نتیجه با تحقیقات Abdollahi *et al*.(2006) نیز که برتری محیط حاوی نمک‌های QL و mQL را نسبت به نمک‌های MS، در ارتباط با افزایش محتوای کلسیم آن‌ها معرفی کردند، سازگار است. بنابر این پایه و با بررسی‌های موردی انجام‌یافته برای افزایش بهتر رقم‌ها و پایه‌های به، محیط mQL به‌عنوان بهترین محیط کشت برای انجام بهینهٔ مراحل تحقیق، تشخیص داده شد.

تأثیر غلظت‌های سایتوکینین 2ip و BAP

در بررسی تأثیر سایتوکینین 2ip و BAP که با غلظت‌های مختلف بر صفات رویشی رقم‌های به موردبررسی در شرایط درون شیشه تحمیل شد، افزایش طول ساقه‌چه، شمار شاخه و طول میانگره نسبت به تیمار شاهد با بهترین بازده مربوط به غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip و ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP بود (جدول ۲).

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف سایتوکینین 2ip و BAP بر صفات رویشی رقم‌های به در شرایط درون شیشه

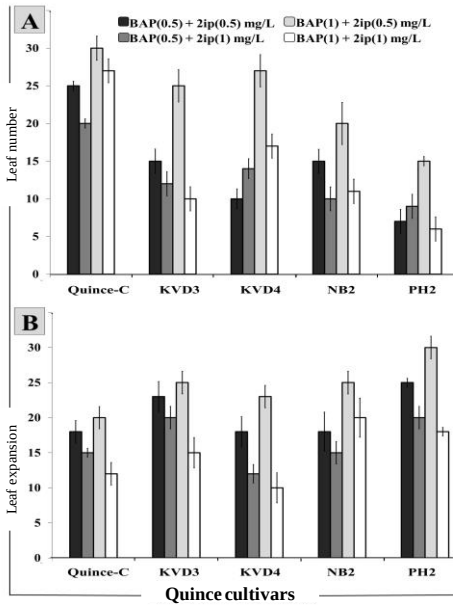
Table 2. Effect of various concentrations of 2ip and BAP cytokinins on vegetative characteristics of quince cultivars in *in vit*ro conditions

Concentrations of various cytokinins	Internode length	Leaf expansion	Leaf number	Shootlet length	Shootlet number
mg/L	mm	mm^2	--	cm	--
0.5 BAP + 0.5 2ip	0.50 a	99.65 a	10.25 a	5.73 b	7.12 b
0.5 BAP + 1 2ip	0.49 a	99.74 a	10.23 a	5.12 d	4.96 d
1BAP + 0.5 2ip	0.48 a	98.95 a	10.28 a	6.05 a	7.66 a
1BAP + 1 2ip	0.52 a	99.83 a	10.25 a	5.29 c	6.83 c

به‌طور کل اختلاف معنی‌داری بین دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد اما نتایج گویای یک رابطهٔ معکوس بین غلظت بالای 2ip (۱ میلی‌گرم بر لیتر) و کاهش میزان سطح برگ در همهٔ رقم‌ها بود (شکل۳-B). همچنین ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2iP به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP برتری خود را به‌منظور ایجاد ریز شاخه‌هایی با بهترین شمار و کیفیت نشان داد (جدول۲). این در صورتی است که در بررسی‌های افزایش درون شیشه پرونس کوئینس Al Maarri *et al*. (1986)، غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP برای بهترین میزان پرآوری گزارش شد. همچنین Sedlak & Paperstein (2009) درکشت درون شیشه‌ای روی محیط کشت MS، بیشترین سطح برگ را در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر 2ip گزارش کردند و دریافتند که در این غلظت شمار شاخه رضایت‌بخش نیست.

با توجه به شکل ۳-B بیشترین پرآوری و طول ساقه-چه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip مشاهده شد درحالی‌که غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، در ایجاد بیشترین شمار برگ و رشد آن کافی بود. این نتایج با کارهای Rossi *et al*. (1991) که بهترین میزان پرآوری شاخساره‌ها را در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP ارائه دادند یکسان بود. همچنین با گزارش Singa (1982) که میزان ۱ تا ۲ میلی‌گرم بر لیتر BAP را برای ریزازدیادی

گلابی توصیه کردند همخوانی داشت. تغییر در نوع و میزان سایتوکینین‌ها در محیط کشت پرآوری شاخساره، می‌تواند در باززایی شاخساره‌ها تأثیر بگذارد (Leblay *et al.*, 1991). بدین معنی که با افزایش غلظت BAP در محیط کشت و افزایش میزان پرآوری شاخساره‌ها، طول شاخه‌ها کاهش یابد.



شکل۳. تأثیر غلظت‌های مختلف سایتوکینین بر شمار برگ (A) و میزان توسعهٔ برگ (B) در رقم‌های به مورد آزمایش

Figure 3. Effect of various concentrations of cytokinins on leaf number (A) and leaf expansion (B) of quince cultivars in *in vitro* conditions

با توجه به مقایسهٔ شمار برگ در رقم‌های مورد آزمایش، بیشترین شمار برگ در غلظت‌های ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP توأم با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2ip و همچنین غلظت‌های ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP توأم با غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر لیتر 2ip، مربوط به پایهٔ کوئینس C و کمترین شمار برگ مربوط به رقم PH2 بود (شکل۳-A). به‌رغم مشاهده کمترین شمار برگ در رقم PH2 بیشترین توسعهٔ برگ در آن دیده شد (شکل۳-B).

توان ریشه‌زایی

نتایج آزمون ریشه‌زایی رقم‌های به برتری تیمار کوتاه‌مدت را با بیشترین درصد ریشه‌زایی، توسعهٔ برگی، طول و کیفیت ریشه در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA، نسبت به تیمار درازمدت با پایین‌ترین درصد ریشه‌زایی نشان داد. تیمارهای بلندمدت به دلیل غلظت کم IBA و یا نسبت یکسان ترکیب‌های اکسینی به سایتوکینینی قادر به تحریک ریشه‌زایی نبودند و با حضور IBA پس از مرحلهٔ ریشه‌زایی سبب زایل شدن توان رشد طولی ریشه شدند (جدول ۳). این یافته‌ها با نتایج Menhaji (2010) مغایرت داشت. او نشان داد که ریشه‌زایی ریز قلمه‌ها در تیمار درازمدت با غلظت کم IBA و یا در تیمارهایی با غلظت یکسان از IBA و BAP که به محیط کشت بدون تنظیم‌کننده‌های رشد انتقال نیافته‌اند، همانند تیمار کوتاه‌مدت با IBA ریشه‌زایی بالایی دارند. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده از توان ریشه‌زایی ریز نمونه‌های رقم‌های امیدبخش به، در تیمار درازمدت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA به همراه ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP ریشه تشکیل نشد و کمترین ریشه‌زایی در تیمار درازمدت با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA انجام پذیرفت. جدول ۳ پایین بودن توان ریشه‌زایی را در تیمار درازمدت با IBA در کنار ریشه‌زایی مطلوب پایه‌ها در تیمار کوتاه‌مدت با IBA به مدت ده روز نشان می‌دهد. بر این پایه در میزان توسعهٔ سطح برگ، طول ریشه، کیفیت ساقه، کیفیت ریشه، میانگین شمار ریشه به ازا هر ریز قلمه در رقم‌های مختلف نیز رفتارهای به نسبت یکسانی مشاهده شد. بیشترین توسعهٔ سطح برگ در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار کوتاه‌مدت و کمترین میزان توسعهٔ آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در تیمار درازمدت بود (جدول۳).

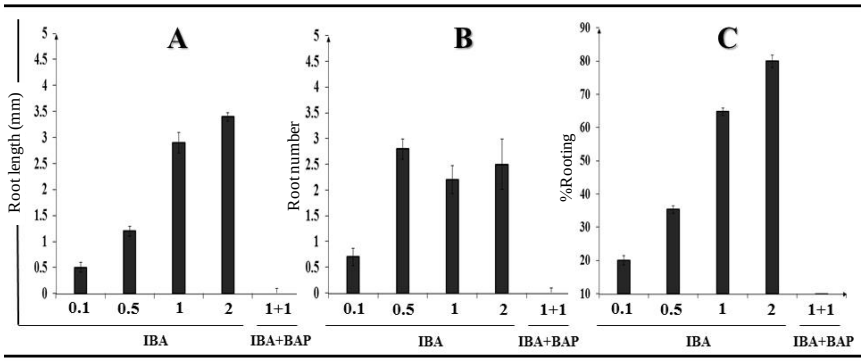
همچنین بیشترین طول ریشه در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار کوتاه‌مدت و کمترین طول ریشه در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار درازمدت ایجاد شد و در این تیمار در اثر استفادهٔ توأم IBA و BAP (هرکدام در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر) ریشه‌زایی اتفاق نیفتاد (شکل۴-A). از مقایسهٔ میانگین شمار ریشه‌های هر ریز قلمه، این نتیجه گرفته شد که در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار کوتاه‌مدت بیشترین شمار ریشه و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار درازمدت کمترین ریشه ایجاد شده است (شکل۴-B). بااین‌وجود کمترین درصد ریشه‌زایی نیز

مربوط به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار درازمدت و بیشترین درصد آن مربوط به غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA در تیمار درازمدت است (شکل۴-C).

جدول ۳. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA بر ریشه‌زایی و صفات رویشی رقم‌های به در شرایط درون شیشه

Table 3. Effect of various concentrations of IBA on the rooting and vegetative characteristics of quince cultivars in *in vitro* conditions

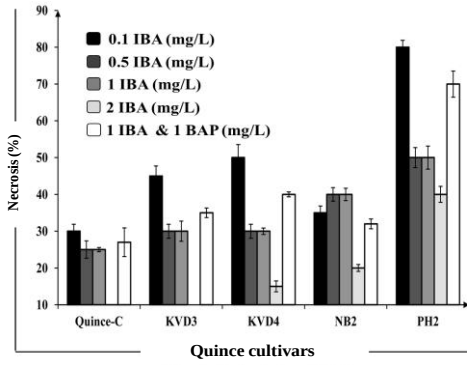
Concentrations of IBA in two treatments of exposure period	Necrosis	Root quality	Shootlet quality	Leaf expansion	Root number	Root length	Percentage of rooting
mg/L	%	--	--	mm^2	--	mm	%
0.1(Long period)	0.4 a	4.7 a	2.0 b	18.8 d	0.7 b	0.5 c	10.0 c
0.5(Short period)	0.2 bc	3.5 b	2.5 a	35.0 b	2.8 a	1.2 b	30.4 bc
1.0 (Short period)	0.2 bc	3.2 bc	2.2 ab	48.8 a	2.2 a	2.9 ab	64.8 ab
2.0(Short period)	0.1 c	2.4 c	2.3 ab	49.5 a	2.5 a	3.4 a	80.0 a
1 IBA+1 BAP(Long period)	0.3 ab	5.0 a	1.9 b	23.0 c	0.0 b	0.0 c	0.0 c



شکل۴. تأثیر غلظت‌های مختلف IBA بر ریشه‌زایی رقم‌های به درون شیشه شامل A) طول ریشه، B) شمار ریشه و C) درصد ریشه‌زایی

Figure 4. Effect of various concentrations of IBA on rooting of quince cultivars in *in vitro* conditions. A) Root length, B) root number, C) percent of rooting

باوجود تفاوتی معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد در اثر غلظت‌های مختلف IBA بر کیفیت ریشه، کیفیت ساقه در غلظت‌های به‌کاررفته تفاوت معنی‌داری نداشت. بهترین کیفیت ریشه در غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و کمترین آن در ساقچه‌هایی که تحت تیمار درازمدت با IBA قرار گرفته بودند، ایجاد شد (جدول ۳). Abdollahi *et al.* (2006) طی بررسی تأثیر تیمار درازمدت و کوتاه‌مدت به غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA در چند رقم گلابی اروپایی، عدم توان ریشه‌زایی ریز نمونه‌ها را در تیمار درازمدت گزارش کردند. همچنین در پژوهشی که روی ریشه‌زایی رقم‌های گلابی انجام دادند غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA برای القای ریشه در شاخه‌ها، بهترین نتیجه را به همراه داشت. بر پایهٔ مشاهدهٔ نتایج این تحقیق در مقایسهٔ میزان بافت‌مردگی در غلظت‌های مختلف IBA اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد، معنی‌دار بود و کمترین میزان بافت‌مردگی در غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA و بیشترین میزان آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA مشاهده شد. در رقم PH2 به‌عنوان حساس‌ترین رقم در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر IBA، بالاترین میزان بافت‌مردگی وجود داشت (شکل۵).



شکل۵. میزان بافت‌مردگی در ریشه‌زایی رقم‌های به در شرایط درون شیشه در حضور غلظت‌های مختلف IBA

Figure 5. Necrosis percentage, following rooting of *in vitro* shootlets of quince cultivars, exposed to the various concentrations of IBA

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان می‌دهد محیط کشت mQL می‌تواند به‌عنوان بهترین محیط برای ریزازدیادی رقم‌های شایان توصیه باشد. غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر سایتوکینین با ایجاد بیشترین پرآوری و توسعهٔ سطح برگ و ایجاد مناسب‌ترین طول میانگره می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ رشد مناسب در افزایش تجارتی این پایه‌ها استفاده شود. با توجه به پایین بودن درصد ریشه‌زایی حتی در مؤثرترین غلظت IBA پیشنهاد می‌شود که در آینده عامل‌های مؤثر در بهبود میزان ریشه‌زایی شناسایی شود تا موفقیت در افزایش تجارتی این رقم‌ها در شرایط درون شیشه افزایش یابد.

REFERENCES

1. Abdollahi, H., Muleo, R. & Rugini, M. (2006). Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Seed and Plant*, 21, 373-348. (in Farsi)
2. Al Maarri, K., Arnaud, K. & Miginiac, E. (1986). *In vitro* micropropagation of quince (*Cydonia oblonga*). *Scientia Horticulturae*, 28, 315-321.
3. Bahmani, R., Gholami, M., Abdollahi, H. & Karami, O. (2009). The effect of carbon source and concentration on *in vitro* shoot proliferation of MM.106 apple rootstock. *Fruit, Vegetable and Cereal Biotechnology*, 3, 35-37.
4. Bakhriddinov, N. B. (1985). Wild relatives of fruit crops in Central Asia and the upper limit of their distribution. (Dep. 3408- 85): 14 p (in Russian)
5. Bell, R. L. (1995). Pre-conditioning effect of proliferation medium on adventitious regeneration of pear. *Horticultural Science*, 30, 832.
6. Chartier-Hollis, J. M. (1993). The induction and maintenance of caulogenesis from undifferentiated callus of quince (*Cydonia oblonga*). *Acta Horticulturae*, 336, 321-325.
7. Depaoli, G., Rossi, V. & Scozzoli, A. (1994). Micro-propagazion delle Piante Ortoflotofrutticole. Edagricole, Bologna, Italy, 450p. (In Italian).
8. D'Onofrio, C. & Morini, S. (2005). Development of adventitious shoots from in vitro grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. *Biologia Plantarum*, 49, 17-21.
9. Druart, P. (1980). La micropropagation des nouveaux sujets portegreffe nanifiants chez le cerisier. In: Proceedings of *Symposium International sur le ceresier*, 25–27 Juin., Centre de Recherches Agronomiques, Gembloux, Belgium, pp. 13-24.
10. Duron, M., Decourtye, L. & Druart, P. (1989). Quince (*Cydonia oblonga* Mill.). In: Bajai, Y.P.S. (Ed), *Biotechnology in agriculture and forestry*. (pp. 42–58.), Vol. 5, Trees II. Springer, Berlin, Germany.
11. FAO. (2012). FAO Word Production Year book. *FAO Publication*, Rome, Italy.
12. Giorgota, A., Preda, S., Isac, M. & 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, 105-110.
13. Gulsen, Y., Sulusoglu, M. & Eroglu, B. (1999). The effect of various agar types on shoot proliferation in micropropagation of Quince-A. In: Proceedings of *Turkish National Horticultural Congress*, 14-17 Sept., Ankara, Turkey, pp. 218-222.
14. Khodaee Chegenee, F., Abdollahi, H., Ershadee, A. & Esna Ashari, M. (2011). Determination of micro-propagation protocol for OH × F333 and OH × F69 pear clonal rootstocks. *Seed and Plant*, 27-2, 297- 312. (in Farsi)
15. Leblay, C., Chevreau, E. & 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.
16. Lloyd, G. & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use shoot-tip culture. In: Proceedings of *International Plant Propagation Society*, 30, 421-427.
17. Manee, A. (1994). Pear and Quince, and their Growing. Iran Technical Publication Company. 113 pp. (in Farsi)
18. Maroofi, A. & Mostafavi, M. (1996). Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. *Acta Horticulturae*, 411, 395-400.
19. Menhaji, M. A. (2010). *In vitro establishment and micro-paropagation of several native pear cultivars for use in genetic transformation orogram*. M. Sc. Thesis. Science and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

20. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
21. Nemeth, G. (1979). Benzyladenine–stimulated rooting in fruit tree rootstocks cultured *in vitro*. *Z Pflanzenphysiol*, 95, 396-389.
22. Pierik, R. L. M. (1997). *In Vitro* Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands, p 335.
23. Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Improved medium for *in vitro* culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
24. Rossi, V., Depaoli, G. & Dal Pozzo, P. (1991). Proliferation of *Pyrus calleryana* Sel. by *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*, 300, 145-148.
25. Rozban, M. R., Arzani, K. & Moeini, A. (2002). Study on *in vitr*o Propagation of some Asian Pear (*Pyrus serotina* Rehd.) Cultivars. *Seed and Plant*, 18, 348-361. (in Farsi)
26. Sedlak, J. & Paperstein, F. (2009). *In vitro propagation of newly bred Czech pear cultivars*. *Acta Horticulturae*, 839, 87-92.
27. Singa, S. (1982). Influence of agar concentration on in vitro shoot proliferation of *Malus* sp. Almey and *pyrus Communis* Seckel. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 107, 657-660.
28. USDA, ARS-GREEN. (2011). Quince enetic resources. Received December 25, 2011 *National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, Oregan*, from http://www.ars.usda.gov.
29. Vavilov, N. I. (1930). Wild progenitors of the fruit trees of Turkestan and the Caucasus and the problem of the origin of fruit trees. In: Proceedings of *9th International Horticulture Congress*, Group B, pp. 271-286.
30. Vitagliano, C., Mensuali-Sodi, A. & Blando, F. (1992). Effect of NaCl on quince (*Cydonia oblonga* Mill) tissue culture. *Acta Horticulturae*, 300, 347-352.
31. Ye, G., Mcneil, D. L., Conner, A. J. & Hill, G. D. (2000). Multiple shoot formation in lentil (*Lens culinaris*) seeds. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30, 1-8.

Iranian Journal of Horticultural Science, Vol. 47, No. 1, Spring 2016

Study on *in vitro* propagation of some promising quince (*Cydonia oblonga*) cultivars

Fereshte Khosravinezhad[1], Hamid Abdollahi[2*], Bahare Kashefi[3], Maryam Hassani[4] and Zeinab Salehi[5]

1, 3. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University of Damghan Branch, Iran

2, 5. Associate Professor and Former M.Sc. Student, Horticulture Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

4. Former M.Sc. Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

(Received: Nov. 30, 2014 - Accepted: Jul. 8, 2014)

ABSTRACT

Among pome fruit trees, quince is the most susceptible tree to fire blight. Following selection of several promising quince cultivars, this research aimed at optimization of in vitro propagation protocol of the selected materials. Therefore, several experiments were carried out for determination of the best culture medium and plant growth regulators for establishment, proliferation and root induction of these cultivars. At first, proliferation and growth of KVD4, NB2 and PH2 genotypes were compared with Quince C and cv. Isfahan (KVD3) as control, in three culture media based on MS, QL and modified QL, in which mQL was observed to have the highest growth, and the best proliferation and shootlets quality. Then, mQL as the base culture medium was used to study effects of 2ip and BAP in two 0.5 and 1 mg/L concentrations. Based on the results, the culture medium containing 2ip (0.5 mg/L) and BAP (1 mg/L) showed the highest number and quality of shootlets. Finally, having examined root induction of the shoots in two long term treatments with IBA, 0.1 mg/L alone, and simultaneously with IBA and BAP (both 1 mg/L), and in short term treatment with IBA at 0.5, 1 and 2 mg/L concentrations, showed that the short term treatment gave better root induction. Also, the highest percentage of roots, leaf development, length and quality of roots resulted in short term treatment with 2 mg/L IBA.

Keywords: culture media, cytokinin, growth regulators, quince, root induction.

* Corresponding author E-mail: HamidAbdollahi@spii.ir Tel: +98 9126103115