Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 50, No 1, Spring 2019 (25-33)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.238854.1293

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۰، شمارهٔ ۱، بهار ۱۳۹۸ (ص ۳۳-۲۵)

بررسی اثر متقابل نوع محیط کشت و میزان تنظیم‌کننده رشد در ریزازدیادی پایه پررشد گلابی (*Pyrus betulifolia*)

معصومه منصوریار[۱*]، حمید عبداللهی[۲]، جواد عرفانی مقدم[۳] و سیدعلیرضا سلامی[٤]
۱ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران
۲. دانشیار پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
٤. دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۵/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۰/۲۳)

چکیده

به‌منظور دست‌یافتن به حداکثر پرآوری در محیط‌های کشت، می‌توان با توجه به نوع گونه گیاهی، از مقادیر مختلف نمک‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده نمود. در برخی مواقع اثر متقابل این مواد می‌تواند نتایج متفاوتی را بر میزان پرآوری گیاهچه‌ها، در شرایط درون‌شیشه‌ای در پی داشته باشد. در این پژوهش تأثیر کاربرد دو محیط کشت پایه MS و QL در ریزازدیادی گلابی گونه *Pyrus betulifolia* مورد مطالعه قرار گرفت که بیشترین میزان پرآوری در محیط کشت QL و بیشترین میزان توسعه‌یافتگی برگ‌ها در محیط کشت MS بود. به‌منظور تولید برگ‌های توسعه‌یافته‌تر در محیط کشت QL و با توجه به تفاوت در میزان خالص یون‌های NO_3^-، NH_4^+، Cl^- و Ca^{2+} در دو محیط کشت مورد بررسی، نمک‌های NH_4NO_3 در سه غلظت ٦/۲۵، ۱۲/۵ و ۱۸/۷۵ میلی‌مولار و $CaCl_2$ در دو غلظت ۰/۹ و ۱/۸ میلی‌مولار به محیط کشت QL اضافه شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده افزایش در میزان NH_4NO_3 و $CaCl_2$ تأثیری در میزان پرآوری ریزنمونه‌ها نداشت؛ اما با افزایش در میزان این دو نمک، سطح برگ ریزنمونه‌ها در محیط کشت QL توسعه یافت. در آزمایشی دیگر با هدف افزایش میزان پرآوری در محیط کشت MS، با افزایش در میزان سایتوکینین BAP در این محیط کشت از ۰/۵ به ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، پرآوری در محیط کشت MS افزایش نشان داد. به‌نظر می‌رسد محیط کشت MS به‌دلیل دارا بودن غلظت بیشتری از نمک‌های ماکرو در مقایسه با محیط کشت QL، نیازمند تنظیم‌کننده رشد بیشتری به‌جهت دست‌یافتن به پرآوری مناسب می‌باشد. در مجموع بر مبنای نتایج این پژوهش، در ریزازدیادی گلابی گونه *P. betulifolia* با توجه به هدف آزمایش، می‌توان از هر دو محیط کشت پایه MS و QL به‌همراه غلظت مناسبی از سایتوکینین BAP و نمک‌های NH_4NO_3 و $CaCl_2$ استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پرآوری، کشت بافت، گلابی، نمک‌های معدنی، BAP.

Study of Interaction effect of culture media and growth regulator concentrations on Micro propagation of pear vigorous rootstock (*Pyrus betulifolia*)

Masume Mansouryar[1*], Hamid Abdollahi[2], Javad Erfani Moghadam[3] and Seyed Alireza Salami[4]
1, 3. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agirculture, Ilam University, Iran
2. Professor Associate of Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Associate Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Aug. 5, 2017 - Accepted: Jan. 13, 2018)

ABSTRACT

In order to achieve maximum proliferation in culture media, different amounts of salts and growth regulators could be used regarding to plant species. Sometimes, interaction effects of these materials could results in different results on explant's proliferation *in vitro* condition. In the present study the effect of two basic culture media including MS and QL on Micro propagation of *Pyrus betulifolia* (pear vigorous rootstock) were studied. The highest amount of proliferation was achieved in QL culture medium and highest amount leaf expansion was in MS culture medium. In order to produce more leaf expansion in QL culture medium and as for existence of difference in ions pure amount including NO_3^-, NH_4^+, Cl^- and Ca^{2+} in two culture media, NH_4NO_3 in three concentrations including 6.25, 12.5 and 18.75 mM and $CaCl_2$ in two concentrations including 0.9 and 1.8 mM were added to QL culture medium. As for the result, increasing NH_4NO_3 and $CaCl_2$ amounts had no effect on proliferation of explants but by increasing NH_4NO_3 and $CaCl_2$ leaf expansion increased in QL culture medium. In the other experiment for increasing of proliferation rate in MS culture medium, by increasing BAP amount, from 0.5 to 2 mg/l in MS culture medium, proliferation in this medium was increased. Apparently in MS culture medium with more concentration of macro elements compared to QL culture medium, it needs to use more growth regulators for achieving suitable proliferation. Totally, Results of this study showed that to succeed micro propagation of *Pyrus betulifolia* in both two basic culture media requires suitable concentrations of BAP, NH_4NO_3 and $CaCl_2$.

Keywords: BAP, mineral nutrient, pear, proliferation, tissue culture.

* Corresponding author E-mail: m.mansouryarm@gmail.com

مقدمه

رشد، تمایز، نمو و تحولات مورفولوژیکی بافت‌های گیاهی نیازمند تأمین تعدادی از عناصر شیمیایی و برخی پارامترهای فیزیکی است. در شرایط محیطی، گیاه با برقرار نمودن یک ارتباط مستقیم با محیط، مواد غذایی لازم را جذب می‌نماید. رشد و تمایزات مورفولوژیکی بافت‌های گیاهی در شرایط درون شیشه، تحت تأثیر اجزای محیط کشت می‌باشد (Perezm *et al*., 2000; Piri & Nazarian, 2001). لذا فرموله نمودن یک محیط کشت که بتواند تمامی احتیاجات گونه گیاهی مدنظر را تأمین نماید از اهمیتی ویژه برخوردار است. محیط کشت MS به‌طور گسترده‌ای در سیستم‌های مختلف کشت بافت کاربرد دارد (Murashige & Skoog, 1962). دیگر محیط‌های کشت با تغییراتی در ترکیب نمک‌های محیط کشت MS به‌وجود آمده‌اند که عمده این تغییرات با توجه به جنس، گونه گیاهی و حتی منشأ ریزنمونه بوده است. ترکیبات معدنی اکثر این محیط‌های کشت از نظر بیشتر ماکروالمنت‌ها دارای کمبود هستند که این کمبودها باعث رشد غیرطبیعی، شیشه‌ای‌شدن و تأثیرات نامطلوب می‌گردد (Ruzic *et al*., 2000). محیط کشت MS در بررسی خصوصیات مهم رشد نسبت به دیگر محیط‌های کشت دارای عملکرد بهتری بوده است (Zarei *et al*., 2013). علی‌رغم توجه به محیط‌های کشت مختلف با ترکیب‌های نمکی متفاوت، میزان و نوع تنظیم‌کننده رشد مورد استفاده نیز از اهمیتی ویژه برخوردار است. به‌جهت دست‌یافتن به پرآوری مناسب در محیط کشتی محتوی میزان بیشتری از انواع نمک‌های پر و کم‌مصرف نیاز به مصرف سایتوکینین بیشتری برای جابه‌جایی نمک‌های به‌کار برده‌شده وجود دارد (Taiz & Zeiger, 2006). از طرفی دیگر بیان شده است که کاربرد سایتوکنین بیشتر، به‌دلیل اثر این تنظیم‌کننده بر غالبیت انتهایی ریزنمونه‌ها، علت افزایش پرآوری می‌باشد (Taji *et al*., 1997). همچنین نظراتی نیز مبنی بر افزایش پرآوری در محیط کشت به‌علت کاهش فشار اسمزی ناشی از مصرف کمتر نمک و به تبع امکان جذب آب و مواد غذایی بیشتر برای ریزنمونه‌ها وجود دارد (Roozban *et al*., 2002). با توجه به اثرهای متقابلی که در بین نمک‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد، جنس و گونه گیاهی و دیگر اجزای محیط کشت و حتی شرایط محیطی وجود دارد می‌توان به‌منظور دست‌یافتن به بهترین ترکیب محیط کشت، غلظت‌های مختلفی از اسیدهای آمینه، ویتأمین‌ها، تنظیم کننده‌های رشد یا مواد آلی مکمل را با نسبت‌های دلخواه به یک ترکیب نمکی مشخص اضافه و بهترین ترکیب را شناسایی نمود (Chawla, 2002).

ریزازدیادی گونه‌های مختلف گلابی معمولاً با سختی همراه می‌باشد (Bell & Reed, 2002) و در این زمینه تلاش‌های بسیاری توسط پژوهشگران مختلف صورت گرفته است (Abdollahi *et al*., 2006; Bell *et al*., 2009; Kadota & Niimi, 2003). در اکثر پژوهش‌های صورت‌گرفته اتفاق نظری مبنی بر وجود یک رابطه مستقیم بین رقم و گونه مورد بررسی با نوع محیط کشت به‌کار رفته، وجود دارد (Bell *et al*., 2012; Leblay *et al*., 1991). در پژوهشی که به‌منظور ارتقای تغذیه معدنی رقم‌های مختلف گلابی در شرایط درون‌شیشه صورت گرفت، مشخص گردید نمک‌های $CaCl_2$، KH_2PO_4 و $MgSO_4$ به‌همراه NH_4NO_3 بیشترین اثر را در رشد و کیفیت ریزنمونه‌های رقم‌های *Pyrus communis* Horner 51، Old Home × Farmingdale 87، Winter Nelis، *Pyrus dimorphophylla* و *Pyrus ussuriensis* Hang Pa Li دارند (Reed *et al*., 2013). گلابی گونه *Pyrus betulifolia* از پایه‌های پررشد گلابی محسوب شده و مقاومت متوسطی نیز به بیماری آتشک (fire blight) دارد.

در اکثر پژوهش‌های صورت گرفته، اثر محیط‌های کشت مختلف و مقدارهای متفاوت تنظیم‌کننده‌های رشد به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته‌اند و کم‌تر به اثر متقابل و توام این‌دو در باززایی و پرآوری ریزنمونه‌ها توجه شده است. این پژوهش جهت مقایسه دو محیط کشت پایه MS و QL و نیز اثر متقابل نوع محیط کشت به‌کار رفته و میزان تنظیم‌کننده رشد مصرفی در ریزازدیادی گلابی گونه *Pyrus betulifolia* به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ریزنمونه‌ها

از نمونه‌های گیاهی پایه پررشد گلابی به‌نام *Pyrus betulifolia* که در پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی در کرج به‌صورت گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای نگهداری می‌شوند، استفاده شد. ضدعفونی اولیه نمونه‌ها که از سرشاخه‌های درخت تهیه شده بودند، به‌صورت ۵ دقیقه استفاده از محلول اتانول ۷۰ درصد (۷/۷) و سپس ۲۰ دقیقه محلول هیپوکلریت سدیم ۵۰ درصد و نهایتاً شستشو با آب مقطر انجام شد.

تهیه محیط‌های کشت MS و QL

در این پژوهش خصوصیات رویشی گلابی گونه *Pyrus betulifolia* در دو محیط کشت پایه شامل محیط MS[1] (Murashige & Skoog, 1962) و محیط QL[2] (Quoirin & Lepoivre, 1977) شامل ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP[3] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[4] مورد بررسی قرار گرفت. این محیط‌های کشت حاوی ۳۰ گرم ساکارز، ۱۱ گرم آگار و ۵/. گرم پکتین بودند که پس از تهیه به‌مدت ۲۰ دقیقه تحت دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر اتوکلاو شدند. pH محیط در حدود ۵/۷±۰/۱ قبل از انجام اتوکلاو تنظیم گردید. ریزنمونه‌های کشت‌شده در شرایط ۱۶ ساعت طول روز و در دمای ۱±۲۵ قرار گرفتند.

تغییر در غلظت نمک‌های NH_4NO_3 و $CaCl_2$ در محیط کشت QL

دو محیط کشت MS و QL در برخی نمک‌ها مانند NH_4NO_3، $CaCl_2.2H_2O$، $Ca(NO_3)_2$ و $MgSO_4.7H_2O$ با یکدیگر تفاوت دارند، که در این پژوهش تأثیر نمک‌های NH_4NO_3 و $CaCl_2$ مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به این‌که برای مقایسه دو محیط کشت، بررسی غلظت کل یون‌های مختلف در دو محیط معیار مناسبی است، غلظت کل یون‌های NO_3^-، NH_4^+، Cl^- و Ca^{2+} مورد نظر قرار گرفت (جدول ۱). این آزمایش به‌منظور تأثیر غلظت‌های مختلف نمک‌های پر مصرف NH_4NO_3 و $CaCl_2$ بر روی رفتارهای رشد ریزنمونه‌های گلابی انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل با دو عامل NH_4NO_3 در سه غلظت ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۱۸/۷۵ میلی‌مولار برابر با ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و عامل $CaCl_2$ در دو غلظت ۰/۹ و ۱/۸ میلی‌مولار برابر با ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار به اجرا در آمد. تغییرات مذکور در نوع و میزان نمک‌های نام برده شده، در محیط کشت پایه QL اعمال شد. در فواصل زمانی هر دو هفته و در طی سه مرحله (۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز) برخی شاخص‌های رشد مانند تعداد و سطح برگ، تعداد و طول ریزشاخه یادداشت‌برداری گردید.

جدول ۱. مقایسه تفاوت‌های دو محیط کشت MS و QL در میزان خالص یون‌های NO_3^-، NH_4^+، Cl^- و Ca^{2+}

Table 1. Comparison of differences between MS and QL culture media in amount of pure ions including NO_3, NH_4^+, Cl^- and Ca^{2+}

	MS	QL
Pure NO_3	20.6 mM	12.4 mM
Pure NH_4	20.6 mM	5 mM
Pure Cl^-	6 mM	0 mM
Pure Ca^{++}	3 mM	3.52 mM

تغییر در غلظت سایتوکینین BAP در محیط کشت MS

در آزمایشی دیگر با افزایش در میزان سایتوکینین BAP در محیط کشت MS از ۰/۵ به ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر، پرآوری و دیگر خصوصیات رشد ریزنمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید. در هر تیمار ۵ تکرار و در هر تکرار ۳ ریزنمونه قرار داده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

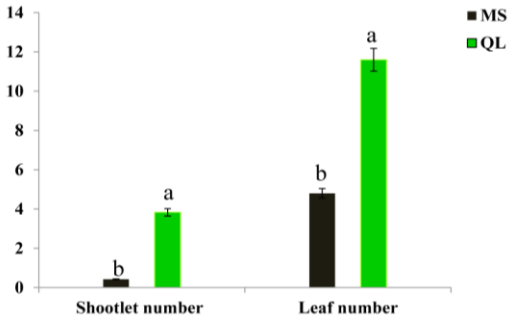
نتیجه و بحث

مقایسه رفتارهای رشد در محیط‌های کشت MS و QL

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، محیط‌های کشت از نظر تعداد ریزشاخه و تعداد برگ در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری داشتند، اما از نظر طول ریزشاخه

1. Murashig and Skoog
2. Quoirin and Lepoivre
3. Benzyl amino purine
4. Naphthaleneacetic acid

تفاوت معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری‌شده برای دو محیط کشت مورد بررسی نشان داد، تعداد ریزشاخه و تعداد برگ تولیدشده در محیط کشت QL بیشتر از محیط کشت MS است (شکل ۱). اگرچه در محیط کشت QL، میزان پرآوری تقریباً دو برابر محیط کشت MS بود اما برگ‌ها توسعه چندانی نداشتند، بدیهی است که هرچه تعداد برگ‌های تولید شده بیشتر باشد، برگ‌ها کوچک‌تر خواهند شد؛ مسلماً در محیط کشت MS که تعداد برگ کمتری تولید شد، برگ‌ها بزرگ‌تر بودند (شکل۴). با توجه به ترکیب‌های نمکی متفاوتی که در این دو محیط کشت وجود دارد، به نظر می‌رسد وجود الگوهای رشد متفاوت در این دو محیط کشت متأثر از غلظت و نوع نمک‌های به‌کار برده شده باشد. بر اساس برخی گزارش‌های موجود، افزایش غلظت نیترات‌آمونیوم در محیط کشت MS، سبب کاهش میزان پرآوری در برخی رقم‌های گلابی گردید (Reed *et al.*, 2013). در ریزازدیادی رقم‌های مختلف انگور استفاده از محیط کشت نیچ و نیچ (NN) نسبت به محیط کشت MS تأثیر بهتری بر رشد گیاهچه‌ها داشت (Yang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2004). این تفاوت ممکن است به‌دلیل رقیق‌بودن محیط کشت NN از نظر میزان کل نمک‌های پرمصرف مورد استفاده نسبت به محیط کشت MS باشد. به‌عنوان نمونه غلظت نیترات‌آمونیوم و نیترات‌پتاسیم موجود در محیط کشت NN تقریباً نصف محیط کشت MS است. همچنین در ریزازدیادی برخی رقم‌های گلابی استفاده از محیط کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو بهتر از محیط کشت MS کامل گزارش شده است (Nosrati *et al.*, 2009). در مجموع به‌نظر می‌رسد پرآوری کم ریزنمونه‌ها در محیط کشت MS، نه‌تنها به‌دلیل میزان نیترات‌آمونیوم بالا در این محیط کشت، بلکه به‌طور کل به‌علت غلظت بالای کل نمک‌های مورد استفاده در این محیط است. مطلب دیگری که در مقایسه این دو محیط کشت از اهمیتی ویژه برخوردار است، نسبت آمونیوم به نیترات می‌باشد. به‌نظر می‌رسد یکی دیگر از علل میزان بالای پرآوری در محیط کشت QL، وجود مقادیر کمتر NH_4^+ (نسبت ۱ به ۲ آمونیوم به نیترات) در این محیط است (جدول ۱). مشاهده شده است تعادل بین NH_4^+ و NO_3^- در باززایی ریزنمونه‌های گلابی اروپایی *P. communis* مؤثر بوده و باززایی بهینه در محیطی با نسبت ۱ به ۳ این یون‌ها حاصل می‌گردد (Leblay *et al.*, 1991). عامل دیگری که در ایجاد رفتارهای رشد متفاوت در این دو محیط کشت مؤثر است، میزان تنظیم کننده رشد مصرفی می‌باشد. سایتوکینین‌ها در جابه‌جایی مواد معدنی مؤثرند (Taiz & Zeiger, 2006). لذا با افزایش در میزان نمک‌های معدنی در محیط کشت، می‌بایست از سایتوکنین بیشتری نیز استفاده نمود. در این آزمایش در هر دو محیط کشت از میزان یکسانی BAP (۱ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. در ادامه تأثیر افزایش BAP در محیط کشت MS مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۱. تأثیر محیط کشت بر تعداد ریزشاخه و برگ در گلابی گونه *P. betulifolia*

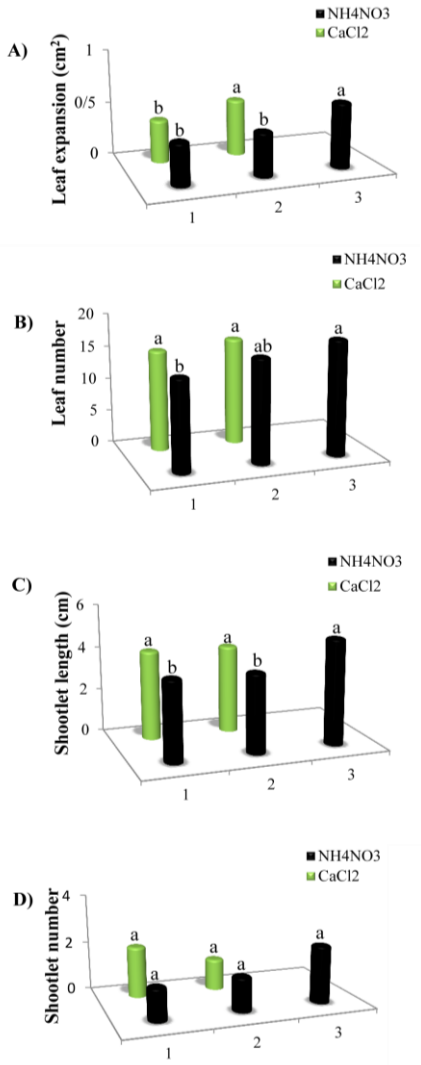
Figure 1. The effect of culture media on leaf number and shootlet number in *P. betulifolia*

تأثیر افزایش نمک‌های NH_4NO_3 و $CaCl_2$ در محیط کشت QL

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، افزایش در میزان NH_4NO_3 تأثیری مثبت بر طول ریزشاخه، تعداد و سطح برگ داشت. اما تعداد ریزشاخه در ریزنمونه‌ها تحت تأثیر غلظت نیترات‌آمونیوم قرار نگرفت، این در حالی است که بر اساس برخی گزارش‌های موجود (Reed *et al.*, 2013; Kadota & Niimi, 2003) پرآوری مناسب رقم‌های مختلف گلابی در غلظت‌های پایین نیترات‌آمونیوم حاصل گردیده است. به‌نظر می‌رسد افزایش ناچیز در تعداد ریزشاخه (که معنادار نشده است) ناشی از افزایش نیترات‌آمونیوم در رقم مورد

مطالعه، به این دلیل است که این رقم به‌طور کلی پتانسیل بالای ژنتیکی برای رشد رویشی دارد که در نتیجه سبب جذب بهتر نیتروژن و افزایش رشد رویشی شده است، افزایش طول ریزشاخه و به تبع آن افزایش در تعداد و سطح برگ‌ها می‌تواند مؤید این مطلب باشد (شکل ۲-A: D). گلابی *P. betulifolia* در مقایسه با دیگر رقم‌های گلابی مانند درگزی و یا کنجونی، دارای برگ‌های کوچک‌تری با حاشیه ناصاف است و اعمال تیمار نمکی مذکور، تأثیر ناچیزی بر روی افزایش سطح برگ داشت (شکل ۳)، از طرفی تأثیر کاربرد مواد معدنی به پررنگی اثر تنظیم‌کننده‌های رشد نیست.

تأثیر تیمار کلرید کلسیم تنها در صفت سطح برگ معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین حاکی از وجود یک رابطه مستقیم بین افزایش کلرید کلسیم و افزایش سطح برگ بود (شکل ۲-A). با توجه به این‌که میزان یون کلسیم در دو محیط کشت MS و QL تقریباً یکسان است، به‌نظر می‌رسد افزایش سطح برگ مشاهده‌شده در محیط کشت QL حاوی مقدارهای بیشتر کلرید کلسیم، به‌علت افزایش یون کلر در این محیط باشد. بر اساس نتایج، اثر مقابل NH_4NO_3 و $CaCl_2$ تأثیری بر ریزازدیادی گونه گلابی مورد مطالعه نداشت.



شکل ۲. نمودارهای تأثیر نمک‌های NH_4NO_3 و $CaCl_2$ بر ویژگی‌های رشد گلابی *P. betulifolia* در محیط QL

Figure 2. Diagrams of NH_4NO_3 and $CaCl_2$ action on growth parameters of *P. betulifolia* in QL medium

	1	2	3
NH_4NO_3 (mM)	6.25	12.5	18.75
$CaCl_2$ (mM)	0.9	1.18	-

تفاوت اصلی محیط‌های کشت مورد مطالعه در میزان یون‌های آمونیوم، نیترات و غلظت کل یون‌هاست، به‌طوری‌که محیط کشت MS دارای میزان بیشتری آمونیوم، نیترات و کلر می‌باشد. برخی پژوهشگران برتری محیط کشت QL نسبت به محیط MS را با افزایش محتوای یون کلسیم در محیط QL مرتبط دانسته‌اند (Abdollahi *et al*., 2005)، از سوی دیگر در مقایسه این دو محیط کشت، توجه به منبع تأمین‌کننده کلسیم نیز مهم است. منبع تأمین‌کننده کلسیم در محیط کشت QL، نیترات‌کلسیم و در محیط کشت MS، کلرید کلسیم است. با توجه به این‌که نیترات در مقایسه با کلرید موجب جذب بیشتر کلسیم می‌گردد (Jalili Marandi, 2009) این خود می‌تواند یکی از علت‌های برتری محیط QL باشد. اما با توجه به نتایج این پژوهش، افزایش کلرید کلسیم در محیط کشت QL نیز مؤثر بوده است. در دیگر پژوهش‌های صورت‌گرفته نیز افزایش کلرید کلسیم در ریزازدیادی گلابی مفید گزارش شده است (Reed *et al*., 2013). با توجه به این‌که این دو محیط دارای میزان تقریباً یکسانی از یون کلسیم هستند، این مسئله می‌تواند بیانگر نقش مؤثر کلر در ریزازدیادی گلابی باشد، که نیاز به انجام بررسی‌های بیشتر در زمینه نقش کلر در ریزازدیادی گلابی وجود دارد.

تأثیر افزایش غلظت سایتوکینین BAP در محیط کشت MS

تولید ریزنمونه‌های باکیفیت و دارای پرآوری مطلوب به‌همراه برگ‌های توسعه‌یافته به‌منظور استقرار و رشد مناسب آنها پس از انتقال به گلخانه یکی از مهم‌ترین هدف‌های ریزازدیادی می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد ریزنمونه‌های گلابی *P. betulifolia* در محیط MS پرآوری مطلوبی ندارند؛ اما برگ‌ها از توسعه‌یافتگی کافی برخوردارند (شکل ۴). در این پژوهش علاوه بر توجه به تفاوت در میزان و نوع نمک‌های به‌کار رفته در دو محیط کشت MS و QL، میزان سایتوکینین BAP نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌جهت در محیط کشت MS که دارای میزان بیشتری از نمک‌ها می‌باشد، غلظت‌های بیشتری از BAP در مقایسه با محیط QL استفاده شد و تأثیر آن بر میزان پرآوری و دیگر خصوصیات رویشی ریزنمونه‌ها بررسی گردید. نتایج نشان دادند افزایش در میزان BAP سبب افزایش میزان پرآوری شد اما تأثیر معنی‌داری بر تعداد برگ و طول ریزشاخه‌ها نداشت (جدول ۲ و شکل ۴). به نظر می‌رسد محیط کشت MS به‌دلیل دارا بودن غلظت بیشتری از نمک‌های ماکرو در مقایسه با محیط کشت QL، نیازمند تنظیم‌کننده رشد بیشتری برای جابه‌جایی نمک‌های به‌کار برده شده می‌باشد (Taiz & Zeiger, 2006)؛ همچنین کاربرد سایتوکینین بیشتربه‌دلیل اثر این تنظیم‌کننده رشد بر غالبیت انتهایی، سبب تولید تعداد ریزشاخه بیشتری می‌گردد. در ریزازدیادی گونه‌های مختلف گلابی در محیط کشت MS استفاده از غلظت‌های ۱/۸ تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP مناسب گزارش شده است (Kadota & Niimi, 2003)، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد و در مقابل استفاده از غلظت کمتر BAP در محیط کشت QL پیشنهاد شده است (Abdollahi *et al*., 2005).

شکل ۳. تأثیر نمک‌های NH_4NO_3 و $CaCl_2$ بر ویژگی‌های رشد گلابی *P. betulifolia* در محیط کشت QL

Figure 3. The effect of NH_4NO_3 and $CaCl_2$ on growth parameters of *P. betulifolia* in QL medium

	A	B	C	D	E	F
NH_4NO_3 (mM)	6.25	6.25	12.5	12.5	18.75	18.75
$CaCl_2$ (mM)	0.9	1.18	0.9	1.18	0.9	1.18

در پژوهشی که بر روی ریزازدیادی *P. betulifolia* صورت گرفت، مشخص گردید تفاوتی بین غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت QL وجود ندارد (Mansouryar *et al*., 2016). افزایش BAP از ۱ به ۱/۲۵ میلی‌گرم در لیتر، بر میزان پرآوری ریزنمونه‌های پایه رویشی G × N15 (هیبرید بادام و هلو) در محیط کشت MS، اثر سوء داشته است (Arab *et al*., 2014)، این گزارش با نتایج پژوهش ما در تناقض است که احتمالاً به‌دلیل تفاوت در جنس‌های مورد بررسی می‌باشد. البته باید در نظر داشت که غلظت زیاد سایتوکینین، بازدارنده نمو شاخساره می‌باشد (Shabbir *et al*., 2009). با در نظر گرفتن نقش سایتوکینین‌ها در رشد و تقسیم سلولی (George, 2008) و با توجه به این‌که تیمارهای تنظیم‌کننده رشد خارجی، از طریق تأثیرگذاری بر غلظت هورمون‌های درونی گیاه نقش خود را ایفا می‌کنند (Gaspar *et al*., 2003) می‌توان نتیجه گرفت که هر ژنوتیپ با دارا بودن مقدار مشخصی از هورمون‌های درونی، رفتاری متفاوت بروز دهد. از طرفی اثر متقابل و برقراری یک تعادل مناسب در میزان هورمون‌های مختلف نیز بر این موضوع تأثیرگذار است، به‌عنوان نمونه اکسین‌ها ذخیره سایتوکینینی گیاه را کنترل نموده و گاهاً از سنتز آن جلوگیری می‌کنند (Nordstrom *et al*., 2004). در مجموع نتایج پژوهش ما نشان داد موفقیت در ریزازدیادی *P. betulifolia* منوط است به انتخاب محیط کشت مناسب با توجه به امکانات موجود، به‌همراه میزان مناسبی از تنظیم‌کننده رشد BAP؛ در استفاده از محیط کشت MS مقدار ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌منظور افزایش پرآوری قابل توصیه است و در محیط کشت QL حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، استفاده از مقدارهای بیشتر $CaCl_2$ برای تولید برگ‌های توسعه‌یافته‌تر پیشنهاد می‌گردد. آنچه در تعیین میزان نمک‌های معدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد مهم است، توجه به پتانسیل ژنتیکی رشد گیاه مورد نظر می‌باشد. گیاهان پررشد به محیط کشتی با نمک‌های معدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد بیشترنیاز دارند و در ریزازدیادی گیاهی با رشد معمولی می‌توان از محیط کشت MS به‌همراه غلظت کمتر BAP، و یا از محیط‌های کشتی که محتوی غلظت‌های کمتر نمک‌های معدنی هستند استفاده نمود.

جدول ۲. تأثیر غلظت‌های متفاوت سایتوکینین BAP بر ویژگی‌های رشد گلابی *P. betulifolia* در محیط کشت MS

Table 2. The effect of different concentrations of cytokinin (BAP) on growth parameters of *P. betulifolia* in MS medium

BAP	Shootlet number	Shootlet length (cm)	Leaf number	Leaf expansion (cm^2)
0.5 mg/lit	1.4c	3.8a	9.6a	0.49a
1 mg/lit	2.8b	4.5a	11.4a	0.4ab
1.5 mg/lit	3.2b	4.28a	10a	0.29b
2 mg/lit	5a	4.68a	9.6a	0.24b

میانگین‌هایی که در هر ستون حروف مشابه دارند از نظر آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means within a column followed by the same letter are not significantly different at $p<0.05$ according to the Duncan`s test.

A **B** **C**

شکل ۴. تأثیر سایتوکینین BAP بر ویژگی‌های رشد گلابی *P. betulifolia* در محیط کشت MS و QL

Figure 4. The effect of cytokinin (BAP) on growth parameters of *P. betulifolia* in MS and QL medium

A	B	C
QL+1mg/lit BAP	MS+1mg/lit BAP	MS+2mg/lit BAP

نتیجه‌گیری کلی

با در نظر داشتن جنبه‌های اقتصادی، در دسترس‌بودن هر یک از محیط‌های کشت MS و QL و توجه به پتانسیل رشد ژنتیکی گیاه (معمولاً گیاهان پررشد به محیط کشتی با نمک‌های معدنی و تنظیم‌کننده‌های رشد بیشترنیاز دارند)، می‌توان در میزان پرآوری و تولید برگ‌های توسعه‌یافته‌تر در گلابی پررشد *P. betulifolia* تعادل ایجاد نمود. بدین‌صورت که در محیط کشت MS از سایتوکینین بیشتری استفاده شود تا پرآوری افزایش یابد؛ و یا در محیط کشت QL از نمک‌های بیشتری استفاده شود تا برگ‌های توسعه‌یافته‌تری رشد یابند. همچنین می‌توان در محیط کشت QL از سایتوکینین کمتری استفاده نمود که در پژوهش حاضر، این مورد به‌دلیل کمبود زمان مورد بررسی قرار نگرفت و بررسی آن به پژوهشگران قابل پیشنهاد می‌باشد.

REFERENCES

1. Abdollahi, H., Muleo, R. & Rugini, E. (2006). Optimization of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. *Scientia Horticulturae*, 108, 352-358.
2. Abdollahi, H., Muleo, R. & Rugini, E. (2005). Study of Basal Growth Media, Growth Regulators and Pectin Effects on Micro propagation of Pear (Pyrus communis L.) Cultivars**.** *Seed and Plant*, 21, 373-384. (in Farsi)
3. Arab, M., Yadollahi, A., Shojaeiyan, A. B., Shokri, S. & Maleki Ghojah, Sh. (2014). Effects of nutrient media, different cytokinin types and their concentrations on in vitro multiplication of G×N15 (hybrid of almond & peach) vegetative Rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12, 81-87.
4. Bell, R. L., Scorza, R. & Lomberk, D. (2012). Adventitious shoot regeneration of pear (*Pyrus* spp.) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108, 229-236.
5. Bell, R. L., Srinivasan, C. & 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.
6. Bell, R. L. & Reed, B. M. (2002). In vitro tissue culture of pear: advances in techniques for micro propagation and germplasm preservation. *Acta Horticulturae*, 596, 412-418.
7. Chawla, H. S. (2002). *Introduction to Plant Biotechnology*. Science Publishers, India. (Technology & Engineering) - 538 pages.
8. Gaspar, T., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Cre`vecoeur, M., Penel, C., Greppin, H. & Dommes, J. (2003). Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39, 85-105.
9. George, E. F. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition, 175–281. Springer.
10. Guo, Y. S., Gao, X. Y., Zhao, Y. H. & Guo, X. W. (2004). Preliminary report on the embryo rescue technique in Venus Seedless grape. *Sino-overseas Grapevine Wine*, 3, 6-8.
11. Jalili Marandi, R. (2009). *Pomology*. Jahad Daneshghahi Publication. (3rd ed.). 251. (In Farsi)
12. Kadota, M. & Niimi, Y. (2003). Effects of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 72, 261-265.
13. Leblay, C., Chevreau, E. & Robin, L. M. (1991). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 99-105.

14. Mansouryar, M., Erfani-Moghadam, J., Abdollahi, H. & Salami, S. A. (2016). Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for some vigorous rootstocks of pear. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 47, 361-370.
15. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
16. Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R. & Astot, C. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 8039-8044.
17. Nosrati, S. Z., Zamani, Z. & Babalar, M. (2009). Micro propagation of Four Cultivars (Dargazi, Natanzi, Shahmiveh and Williams) of Pear (*Pyrus communis* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 40, 83-91.
18. Perezm, T. O., Lopez, J. M., Egea, L. & Burgos, L. (2000). Effect of basal media and growth regulators on the *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armenica* L.). *Canino. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75, 283-286.
19. Piri, Kh. & Nazarian, F. (2001). *Manual of plant tissue culture*. (2nd ed.). Bou Alisina University Publication.
20. Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Improved medium for in vitro culture of *Prunus* sp. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
21. Reed, B. M., Sugae, W., DeNoma, J. & Niedz, P. R. (2013). Improving in vitro mineral nutrition for diverse pear germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49, 343-355.
22. Roozban, M. R., Arzani, K. & Moieni, A. (2002). Study on In Vitro propagation of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cultivars. *Seed and Plant*, 18, 348-361. (in Farsi)
23. Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. & Culafic, L. (2000). Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 63(1), 9-14.
24. Shabbir, A., Hameed, N., Ali, A. & Bajwa, R. (2009). Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa Indica* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), 2877-2882.
25. Taji, A. M., Dodd, W. A. & Williams, R. R. (1997). *Plant Tissue Culture practice.* UNE press, Australia. 171p. (3rd ed).
26. Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology*. Sinauer Associates. (3rd ed).
27. Yang, D., Shengli, W., Yang, X. & Cao, Z. (2006). *In vitro* embryo rescue culture of F1 progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. *Plant Growth Regulation*, 51, 63-71.
28. Zarei, M., Garoosi, Gh., Nezami, E., Hosseini, R. & Ahmadi, J. (2013). The Effect of Medium, Carbon Source, Light Spectrum and Style Treatment of Auxin on Shoot and Root Regeneration of Gisela 6 Root Stock. *Journal of Cell & Tissue*, 4(2), 169-185.