دانشگاه تبریز

دانشکده کشاورزی

گروه علوم باغبانی

پایاننامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

میوهکاری

اثر اتیولاسیون ریزنمونه و پلیوینیلپیرولیدون بر استقرار و اندامزایی درونشیشهای مریستم گلابی ایرانی (*Pyrus glabra*)

استادان راهنما

دکتر محمدرضا دادپور

دکتر علیرضا مطلبیآذر

استاد مشاور

دکتر فریبرز زارع نهندی

پژوهشگر

سلیم اجاق

بهمن ۹۰

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان من است، به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است وسرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش.نمی‌کند، **این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم.**

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. بدون شک جایگاه و منزلت معلم، اجّل از آن است که در مقام قدردانی از زحمات بی شائبه ی ایشان ، با زبان قاصر و دست ناتوان، چیزی بنگاریم.

اما از آنجایی که تجلیل از معلم، سپاس از انسانی است که هدف و غایت آفرینش را تامین می کند و سلامت امانت‌هایی را که به دستش سپرده‌اند، تضمین؛ بر حسب وظیفه ازپدر و مادر عزیزم...این دو معلم بزرگوارم که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت هایم گذشته اند و در تمام عرصه های زندگی یار و یاوری بی‌چشم داشت برای من بوده‌اند کمال تشکر را دارم. از اساتید با کمالات و شایسته؛ جناب آقایان دکتر محمدرضا دادپور و دکتر علیرضا مطلبی آذر که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند کمال تشکر و قدردانی را دارم. از استاد صبور و با تقوا ، جناب آقای دکتر فریبرز زارع نهندی که زحمت مشاوره این رساله را متقبل شدند کمال تشکر را دارم. از استاد فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای دکتر ناصر مهنا که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید.

همچنین از تمامی دوستان و همکلاسی های عزیزم جناب آقایان مهندس، محمدرضا فتح الهی، فرشاد کاکاوند، ارکان کریمی و غلامرضا گوهری و همچنین سرکار خانم، سمیه فریدی نیچران و سمیه حاجیان، که مرا در اجرا وتدوین این پایان نامه کمک کردند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

سلیم اجاق

بهمن ماه ۹۰

نامخانوادگی: اجاق نام: سلیم

عنوان پایان‌نامه: اثر اتیولاسیون ریزنمونه و پلی‌وینیل‌پیرولیدون بر استقرار و اندام‌زایی درون‌شیشه‌ای مریستم گلابی ایرانی (*Pyrus glabra*)

استاد راهنما: دکتر محمدرضا دادپور دکتر علیرضا مطلبی آذر

استاد مشاور: دکتر فریبرز زارع نهندی

مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد رشته: باغبانی گرایش: علوم باغبانی دانشگاه: تبریز

دانشکده: کشاورزی تعداد صفحات: ۵۲

واژههای کلیدی: مریستم، اتیوله کردن، پلی وینیل پیرولیدون، قهوه ای شدن، *Pyrus glabra*

چکیده:

جایگاه گلابی در میوه‌کاری، موجب شده است که پژوهش‌های فراوانی بر روی کشت درون شیشه ای این گیاه، انجام پذیرد. همه یافته‌ها نشانگر وجود پیچیدگی‌های فراوان، در استقرار و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در جنس پیروس هستند. مهمترین عامل مرگ ریزنمونه‌های مریستمی و بافتی این جنس، پدیده فنلی شدن آنها است. در این آزمایش، نقش تیمار پلی وینیل پیرولیدون (پی وی‌پی) و اتیولاسیون بر روی زنده‌مانی مریستم گلابی گلابرا در کشت درون شیشه ای بررسی گردید . برای این منظور، مریستم شاخه‌های سبز و اتیوله شده در محیط آب دیونیزه و پی وی‌پی (با دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی ام)، سواسازی شده و پس از یک ماه استقرار در محیط کشت، میزان زنده‌مانی و اندام‌زایی آنها با بهره‌گیری از روش‌های میکروسکوپی نوری و فلورسنس (سنجش کانال طیف نوری) تعیین گردید. برای این منظور از فلورسئین دی استات و طیف ۵۱۰ نانومتر در میکروسکوپی فلورسنس استفاده شد. نتایج نشان داد زنده‌مانی ریزنمونه‌های برداشت شده از شاخه‌های اتیوله شده به طور معنی‌داری از ریزنمونه‌هایی که از شاخه سبز برداشت شده بودند بالاتر بود. پیش تیمار ریزنمونه ها با PVP نه‌تنها زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را

بعد از ۲٤ ساعت بلکه زنده‌مانی آنها را بعد از یک ماه از آغاز کشت نیز به طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. بعد از یک روز از کشت بیشترین میزان زیوایی مریستم‌ها در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر PVP بدست آمد. تیمار PVP بر روند برگ‌زایی و اندام‌زایی ریزنمونه‌ها معنی دار نبود. روند برگ - زایی ریزنمونه‌های برداشت شده از هر دو نوع شاخه ابتدا پایین و با افزایش زمان افزایش پیدا کرد. ریزنمونه‌های بدست آمده از شاخه‌های اتیوله شده روند برگ‌زایی و اندام‌زایی بالاتر و پلاستوکرون کوتاه‌تری نسبت به ریزنمونه‌های بدست آمده از شاخه سبز داشتند.

فصل اول

۱-۱ گیاهشناسی گلابی ۲
۱-۲ گلابی‌های بومی ایران ٤
۱-۳ آنچوچک (*Pyrus glabra*) ٤
۱-٤ ارزش اقتصادی گلابی ٥
۱-٥ مفهوم ریزازدیادی ٦
۱ـ٦ ریزازدیادی گلابی ۷
۱-٦-۱ مرحله استقرار ریزنمونه ۸
۱ـ٦ـ۲ مرحله پرآوری ۹
۱-٦-۳ القای ریشه ۱۳
۱-٦-٤ سازگاری و خوده‌ی گیاهچه‌ها ۱٦
۱-۷ قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها ۱۷
۱-۸ اهداف آزمایش ۲۳

فصل دوم

۲-۱ مواد گیاهی ۲۵
۲-۲ نحوه ضدعفونی ریزنمونهها ۲۶
۲-۳ جداسازی و کشت ریزنمونهها ۲۶
۲-٤ محیط کشت و شرایط نگهداری ۲۷
۲-۵ تیمارهای استفاده شده ۲۸
۲-٦ اندازهگیری صفات و بررسیهای میکروسکوپی ۲۹
۲-۷ طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل دادهها ۳۰

فصل سوم

۳-۱ تاثیر تیمارها بر میزان زندهمانی ریزنمونهها ۳۵
۳-۱-۱ تاثیر ارتفاع شاخه بر زندهمانی ریزنمونهها ۳۵
۳-۱-۲ تاثیر تیمار PVP بر زندهمانی ریزنمونهها ۳۷
۳-۲ اثر تیمارهای اعمال شده بر روند برگزایی ریزنمونهها ٤۰
۳-۲-۱ تاثیر نوع شاخه بر روند برگزایی و اندامزایی ٤۰

فهرست

ت

۳_۳ تاثیر بخارهای مختلف بر پلاستوکرون ٤١

۳-٤ نتیجه گیری کلی ٤٣

۳_٥ پیشنهادات ٤٣

منابع ٤٤

فهرست جداول

جدول ۱–۱ گونه‌های گلایی و توزیع جغرافیایی آنها ۳

جدول ۲–۱ کد بندی تیمارهای مورد استفاده ۲۹

نمودار ۳–۱–۱: مقایسه اثر نوع شاخه بر درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها ۳۶

فصل اول

بررسی منابع

۱ ـ ۱ گیاه‌شناسی گلابی

جنس پیروس [۱] متعلق به تیره رزاسه [۲] و زیرتیره مالوئیده [۳] و راسته رزالس [٤] می‌باشد. تعداد کروموزوم‌های پایه آن ۱۷ و تعداد کروموزوم‌های سوماتیکی ۳٤ می‌باشد (2n=2x=34). هرچند کلونهای تری‌پلوئید و تتراپلوئید در گونه‌های زراعی بوجود آمده‌است هیچ یک از گونه‌های وحشی، پلی‌پلوئید یا آینوپلوئید[٥] نیستند.(چالیس و وست‌وود ، ۱۹۷۳).جنس پیروس احتمالاً از آسیای مرکزی، نواحی کوهستانی غرب و جنوب چین منشا گرفته‌است و در دو جهت رو به شرق ورو به غرب از خاستگاه اصلی خود حرکت کرده‌است . گونه‌سازی[٦] این جنس اساساً در آسیای شرقی و مرکزی، هیمالیا، قفقاز، آسیای صغیر و اروپای‌شرقی ایجاد شده است(بیل و لتای،۲۰۱۱).همه گونه‌های جنس پیروس بومی اروپا، اسیا و کوهستانهای شمال آفریقا می‌باشند(ولکو و همکاران،۲۰۱۰). هر چند تعدادی از گونه‌های جنس پیروس در امریکا اهلی شده‌اند ولی این جنس بومی امریکا نمی‌باشد(بیل و لتای،۲۰۱۱).

بیان دقیق تعداد گونه‌های جنس گلابی در جهان بسیار دشوار می‌باشد زیرا این گونه‌ها به آسانی با یکدیگر تلاقی پیدا کرده و نتاج‌های حاصل از این تلاقی‌ها وضعیتهای تاکسنومیکی مختلفی را به خود اختصاص داده‌اند(ولکو و همکاران،۲۰۱۰). چالیس و وست‌وود(۱۹۷۳) با مطالعه تاکسونومیکی دقیقی بر پایه مشخصات شیمیایی و گیاهشناسی روی جنس پیروس ۲۲ گونه اصلی را برای این جنس رده‌بندی کرده‌اند.(جدول۱). بقیه گونه‌های غیر اصلی ممکن است واریته‌های گیاهشناسی، زیرگونه یا هیبریدهای بین گونه‌ای باشند. این ۲۲ گونه اصلی در سرتاسر نواحی معتدله در بیشتر از ۵۰ کشور بوجود آمده‌اند که بر پایه توزیع جغرافیایی به چهار زیرگروه، گلابی‌های آسیایی، گلابی‌های غرب آسیا و دریای مدیترانه، گلابی‌های شمال آفریقا و گلابی‌های اروپایی گروه بندی می‌شوند(چالیس و وست‌وود، ۱۹۷۳). براوز (۱۹۹۳) لیست ۳۸ گونه اصلی،۳۳ هیبرید بین‌گونه‌ای و چهار تلاقی جنس پیروس را با جنسهای

[1] pyrus
[2] Rosaceae
[3] Maloideae
[4] Rosales
[5] aneuploid
[6] Speciation

سوربوس[1]، سیدونیا[2] و مالوس[3] را ذکر کرده است.

منابع ژنتیکی گلابی به خاطر تنوع مورفولوژیکی پایین، فقدان افتراق صفات بین گونه‌ها و نیز توانایی بالا در تلاقی بین گونه‌ای هنوز به طور کامل شناسایی نشده است (ولکو و همکاران،۲۰۱۰).

جدول ۱–۱ گونه‌های گلابی و توزیع جغرافیایی آنها

Species	Distribution
Asian pea pears	
P. calleryana Decne.	Central and South China
P. koehnei Schneid.	South China, Taiwan
P. fauriei Schneid.	Korea
P. dimorphophylla Makino	Japan
P. betulaefolia Bunge	North-East China
Asian large fruited pears	
P. pyrifolia Nakai	Japan, Korea, Central China
P. pashia P. Don.	Nepal, Pakistan, India, West China
P. hondoensis Nakai et Kikuchi	Japan
P. ussuriensis Maxim.	North-East China, Korea, Siberia
P. kawakamii Hayata	Taiwan, South-East China
West Asia	
P. amygdaliformis Vill.	Mediterranean Europe
P. elaeagrifolia Pall.	Turkey, Russia, South-East Europe
P. salicifolia Pall.	Iran, Russia
P. syriaca Boiss.	Lebanon, Israel, Iran
P. regelii Rehd.	Afghanistan, Russia
P. globra Boiss.	Iran
North Africa	
P. gharbiana Trab.	Morocco
P. longipes Coss. et Dur.	Algeria
P. mamorensis Trab.	Morocco
Europe	
P. communis L.	Europe, Turkey
P. nivalis Jacq.	Central, South, West Europe
P. cordata Desv.	South Europe

[1] Sorbus
[2] Cydonia
[3] Malus

۱ ۲ گلابی‌های بومی ایران

ایران یکی مراکز مهم تنوع جنس پیروس در جهان به شمار می‌رود. تعداد واقعی گونه‌های گلابی در ایران هنوز به طور کامل مشخص نیست. طبق نظر مظفریان ۱۲ گونه گلابی در ایران وجود دارند. زمانی و عطار (۲۰۱۰) گزارش کردند که تعداد گونه‌های گلابی موجود در ایران می‌تواند تا ۱۸ گونه افزایش پیدا کند که هشت عدد از این گونه‌ها مختص ایران می‌باشند. از گونه‌های مختص ایران می‌توان به *Pyrus hyrcana*، *Pyrus grossheimii, Pyrus glabra, Pyrus farsistanica, Pyrus kandevanica,* و *Pyrus mazanderanica*(مظفریان،۱۳۸۳) و *Pyrus longipedicellata* (زمانی و عطار،۲۰۱۰) اشاره کرد. نواحی پراکنش جنس پیروس در ایران کوهستانها البرز، زاگرس، کوههای آذربایجان و کردستان و همچنین برخی از ارتفاعات جنوب و شرق ایران می‌باشند. گونه‌های زاگرسی که شامل *P. glabra*، *P. salicifolia*، *P. elaegnifolia*، *P. syriaca*، *P.expiron* و همچنین *P. farsistanica* هستند، در مقایسه با گونه های البرزی مقاومت بیشتری به گرما و خشکی دارند (زمانی و همکاران، ۲۰۰۸).

گونه‌های وحشی گلابی ایران دارای تنوع فراوان و ویژگی های ژنتیکی ارزشمندی همانند مقاومت بالا به دمای پائین، نیاز سرمایی پایین، میوه‌بندی بالا، بروز پارتنوکارپی و مقاومت بالا به خشکی، خاکها آهکی و قلیایی می‌باشند (شریفانی و همکاران ۲۰۰۸). پایداری گونه‌های بومی ایران در برابر عوامل نا مساعد زنده وغیره زنده محیطی نشان دهنده دارا بودن ژن‌های مفید و باارزشی مانند ژنهای مقاومت به آفات و امراض و یا عوامل نامساعد غیرزنده محیطی می‌باشند بنابراین می‌توان از این گونه‌ها در برنامه‌های بهنژادی و یا بهگزینی پایه های نویدبخش گلابی بهره جست.

۱ ۳ آنچوچک (*Pyrus glabra*)

درختی به ارتفاع ٦-٥ متر، شاخه‌ها خاردار ، بدون کرک و خاکستریرنگ هستند. برگها به طول ١١-٤ و با عرض ٢/٣-٧/. سانتی‌متر به شکل سرنیزه‌ای-مستطیلی، با قاعده گرد یا گوه‌ای، با نوک نسبتا کند یا با نیش کوتاه، برگها کامل و با کنگره های بسیار ریز، بدون کرک، کم‌وبیش کدر(مات) هستند.دمبرگها به طول ٤-١ سانتی‌متر، با کرک‌های بسیار پراکنده هستند. گل‌اذین ٨-٥ گلی با طول دمگل ٣/٥-٧/.

سانتی‌متر می‌باشد. میوه‌های آن تقریبا کروی، به قطر ۲/۵-۱/۵ سانتی‌متر، قهوه‌ای-سبز رنگ هستند دمگل میوه به دشواری ضخیم شده و بطول تا ۳/۵ سانتی‌متر می‌باشند. این گونه انحصاری ایران است. پراکنش جغرافیایی آن در ایران استانهای فارس، کهگیلولیه و بویر احمد، لرستان(مظفریان، ۱۳۸۳)، کردستان و آذربایجان غربی(زمانی و همکاران،۲۰۰۸) می باشد.

تصویر۱-۱ *Pyrus glabra*

۱ ٤ ارزش اقتصادی گلابی

گلابی‌های آسیایی تصور می‌شود که در دوره قبل از تاریخ اهلی شده باشند و حداقل ۳۰۰۰ سال پیش در چین کشت می‌شده‌اند.گلابی‌های اروپایی نیز تصور می‌شود ۱۰۰۰ قبل از میلاد مسیح در اروپا کشت می‌شده‌اند.گلابی سومین محصول میوه مهم مناطق معتدله بعد از انگور و سیب می‌باشد. میزان تولید جهانی آن در سال ۲۰۰۹، ۲۱/۹ میلیون تن تخمین زده شده است(FAO 2010). آسیا با تولید ١٦/٤ میلیون تن و به دنبال آن اروپا با ۳/۹ میلیون تن، امریکای شمالی و مرکزی ۸۸۵۳۲۱ تن و امریکای

جنوبی ٧٤٤٥٣٢ تن مهمترین مراکز تولید گلابی هستند. حدود ٧٢ درصد از کل گونه‌های گلابی که به صورت اقتصادی کشت شده‌اند بومی آسیا می‌باشند. تولید گلابی‌های اروپایی(*P. communis*) در پنج مرکز تولید، اروپا، امریکای‌شمالی، امریکای‌جنوبی، شمال آفریقا و اقیانوسیه متمرکز شده‌است. در حالیکه تولید گلابی‌های آسیایی *P. pashia, P.× brastchneideri* و *P. pyrifolia* در آسیا (جنوب شرقی) متمرکز شده‌است(بیل و لتای،٢٠١١).

سطح زیر کشت گلابی در ایران در سال ٢٠١٠ ، ١٣٣٠٠ هکتار و میزان تولید آن ١٦٠٠٠٠ تن تخمین زده شده‌است(FAO2011). اکثر ارقام گلابی کشت شده در ایران جزو گلابی‌های اروپایی می‌باشند(صفرپور وهمکاران،١٣٨٧).

١ ٥ مفهوم ریزازدیادی[1]

در کل کشت‌بافت درون‌شیشه‌ای یا ریزازدیادی به عنوان کشت سلول، بافت، یا اندام سوماتیکی گیاهان در شرایط کنترل شده درون‌شیشه‌ای به منظور تکثیر تعداد زیادی از گیاهان که از نظر ژنتیکی مشابه گیاهان مادری هستند و در دوره زمانی کوتاه‌تری نسبت به تکنیکهای متداول ازدیاد رویشی(قلمه‌زنی، پیوند،خوابانیدن،تقسیم بوته و غیره) تکثیر شده‌اند، تعریف می‌شود. کلون کردن درون‌شیشه‌ای بر پایه این واقعیت است که قسمتهای مختلف گیاه شامل، جوانه، مریستم، بافت و سلول تواناییی باززایی به گیاه کامل را در شرایط مناسب درون‌شیشه دارند.دو روش اصلی در ازدیاددرون شیشه‌ای قابل تمایز است.

a) تکثیر از طریق جوانه‌های جانبی و انتهایی که این ازدیاد برپایه وجود قبلی مریستم‌ها می‌باشد و شامل ١) کشت نوک مریستم ٢) کشت نوک شاخه و ٣) کشت قطعات‌گرهی شاخه می‌باشد.

b) تکثیر از طریق تشکیل شاخه یا جنین سوماتیکی نابجا که می‌تواند به دو صورت ١) مستقیماً از بافت جدا شده بدون تشکیل کالوس (ارگانوژنز[2] و جنین زایی[3] مستقیم) و یا ٢) به صورت غیرمستقیم،

[1] Micropropagation
[2] Organogenesis
[3] Embryogenesis

طوریکه شاخه یا جنین بر روی کالوسی که قبلا تشکیل شده است باززایی می‌شوند (ارگانوژنز یا جنین‌زایی غیرمستقیم) صورت می‌گیرد. در خیلی از گونه‌های گیاهی ارگانوژنز مستقیم بندرت اتفاق می‌افتد. بطور کلی زمانی که ازدیاد از طریق باززایی نابجا و مخصوصا زمانی که باززایی بر روی کالوس انجام می‌شود و همچنین کالوس برای مدت طولانی نگه‌داری می‌شود تغییرات سوماکلونال [1] به میزان زیادی افزایش می‌یابد که به عنوان یک مشکل در ازدیاد تجاری از این طریق می‌باشد(دوبرانسکی و داسیلوا،۲۰۱۰). از مزایای تکنیک های ریزازدیادی نسبت به تکنیک‌های مرسوم می‌توان به، توانایی تکثیر تعداد خیلی زیادی پروپاگول در زمان کوتاه، توانایی تکثیر گیاهان در تمام طول سال، تولید گیاهان عاری از بیماری از طریق حذف آلودگهای ویروسی، باکتریایی و قارچی و توانایی حمل و نقل تعداد زیادی از مواد گیاهی به صورت سریع، کارآمد و نسبتا ارزان اشاره کرد. علاوه‌بر استفاده اصلی از ریزازدیادی(تکثیر تجاری کلونال و سریع) این تکنیک‌ها برای چندین هدف دیگر مانند، ۱) نگهداری از گیاهان مادری عاری از پاتوژن ۲) نگهداری طولانی مدت ژرم‌پلاسم و ۳) ایجاد و انتخاب گیاهان ترانس‌ژنیک خیلی مهم می‌باشد(آلتمن، ۲۰۰٦).

درکل چهار مرحله برای موفقیت در ریزازدیادی لازم می‌باشد، ۱) استقرار درون‌شیشه‌ای ریزنمونه ۲) پرآوری شاخه ۳) ریشه‌دهی ریزشاخه‌ها و ٤) سازگاری و انطباق گیاهچه‌ها با شرایط محیطی

۱ ٦ ریزازدیادی گلابی

جایگاه گلابی در میوه‌کاری، موجب شده است که پژوهش‌های فراوانی برروی کشت درون شیشه ای این گیاه، انجام پذیرد. ازدیاد درختان گلابی با بهره گیری از روش‌های مرسوم (پیوند، خوابانیدن، ریشه‌دار کردن قلمه‌ها و...) نیاز به کمابیش دوره زمانی سه ساله، سرمایه گذاری، آماده‌سازی نهالستان و بکارگیری افراد ماهر دارد که هزینه‌های ابتدایی تولید را بالا خواهد برد (شیبلی و همکاران، ۱۹۹٦). گلابی‌های وحشی همیشه در معرض خطر جنگل‌زدایی و قطع مداوم بویسله انسان هستند که منجر به از بین رفتن این منابع ژنتیکی با ارزش می‌شود. بنابراین استفاده از تکنیک‌های ریزازدیادی، می‌تواند روشی جایگزین

[1] Somaclonal variation

برای ازدیاد کلونال و سریع، پدید آوردن گیاهان سالم و عاری از بیماری ، دسترسی مداوم به ارقام و پایه‌های گلابی در تمام طول سال و همچنین نگهداری طولانی مدت از ژرم‌پلاسم عاری از پاتوژن گلابی باشد.

تکنیک‌های ریزازدیادی برای بیشتر از هفت گونه گلابی گزارش شده است. از زمان گزارش اولین گزارش در مورد ریزازدیادی گلابی بر روی پایه OH × F51 در سال ۱۹۷۹ توسط چنگ پیشرفت‌های خیلی زیادی در این زمینه انجام شده است.

۱ ٦ ٤ مرحله استقرار ریزنمونه

از نقطه‌نظر ازدیاد گیاهان شبیه به اصل[1] انتخاب ریزنمونه خیلی مهم می‌باشد. نوک مریستم، نوک شاخه (در حال رشد یا در حال خواب) یا قطعات گرهی بخاطر پایداری ژنتیکی در آنها می توانند استفاده شوند(دوبرانسکی و داسیلوا، ۲۰۱۰). در ازدیاد درون‌شیشه‌ای گلابی هر سه نوع ریز نمونه استفاده شده است. نوع ریزنمونه و نیز فصل جمع‌آوری آن می تواند بر درصد استقرار آن تاثیر بگذارد. آنیرود و کانوار(۲۰۰۸) گزارش کردند که قطعات گرهی ریزنمونه بهتری نسبت نوک‌شاخه برای ریزازدیادی *P. pyrifolia (BURM F) Nakaia* هستند و همچنین زمانی که ریزنمونه ها در فصل بهار و زمستان جمع‌آوری شده بودند درصد استقرار ریزنمونه‌ها بالاترین مقدار بود. حداقل استقرار ریزنمونه و بالاترین درصد قهوه‌ای‌شدن و آلودگی در طول فصول بارانی مشاهده شد. هاک و کالو (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که درصد رشد و جوانه‌زنی ریزنمونه‌های *P.pyrifolia (BURM F) Nakaia* که در فصل بهار جمع‌آوری شده بودند نسبت فصل پاییز و زمستان ۳۰ درصد بیشتر بود. محیط غذای استفاده شده در این مرحله اکثرا محیط MS[2] و در مواردی نیز ازمحیط ۱/۲MS(شیبلی و همکاران, ۱۹۹٦), WPM[3] (کادوتا و همکاران ۲۰۰۳)، QL[4] (دامیانو وهمکاران،۲۰۰۲) و Cheng (یو و رید ۱۹۹۵) استفاده شده است. استفاده از تنظیم کننده‌های رشدی، در کشت درون‌شیشه‌ای الزامی می‌باشد. در این میان سایتوکینین ها و سپس

[1] True-to type
[2] Murashige and Skoog
[3] woody plant medium
[4] Quoirin and Lepoivre

اکسین‌ها بیشترین تاثیر را روی ریزنمونه دارند. در مرحله استقرار اکثرا از سایتوکینین BA[1] در گستره غلظت ۰/. تا ۲ میلی گرم در لیتر و اکسین IBA[2] در گستره غلظت ۰/۱ تا ۰/۵ میلی گرم در لیتر استفاده شده است.

فنون ریزازدیادی از طریق کشت مریستم به منظور تولید گیاهان عاری از پاتوژن برای چندین رقم متعلق به گونه های *P. serotina* ، *P. communis* ، *P. syriaca* و *P. pyrifolia* گزارش شده است. غلظت و نوع این تنظیم کننده‌ها بر روی رشد درون‌شیشه‌ای مریستم موثر هستند. هیرابایاشی و همکاران (۱۹۸۷) تاثیر غلظت‌های مختلف GA_3[3]، NAA[4] و BA را روی کشت درون‌شیشه‌ای مریستم گلابی های *Pyrus serotina* و *Pyrus communis* بررسی کردند. آنها نشان دادند که در مرحله استقرار هم طول و هم تعداد برگ در گستره غلظت ۱ تا ۱۰ میکرومول BA افزایش می‌یابد. مریستم بدون BA رشد چندانی ندارد. همچنن در غلظت‌های بالای BA (۵۰ میکرو مول) رشد مریستم محدود می شود. ترکیب NAA با BA یا GA_3 با BA تعداد برگ یکسانی با زمانی که BA به تنهایی بکار رفته بود را نتیجه داد. ولی استفاده از NAA باعث کوتاه‌تر شدن طول برگ و استفاده از GA_3 اندکی باعث تحریک طویل شدن برگ شد. بانو و همکاران در سال ۱۹۸۹ در کشت مریستم (کمتر از ۰/۵ mm) کولتیوار های مختلف گلابی *P.serotina* گزارش کردند که نوک مریستم‌ها به خوبی روی محیط نیم‌غلظت MS تکمیل شده با یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA استقرار پیدا کردند. همچنین شیبلی و همکارانش (۱۹۹۷) در کشت مریستم گلابی *P. syriaca* با استفاده از ریزنمونه هایی به اندازه (۰/۵ ـ ۰/۷ mm) از محیط کشت MS نیم‌غلظت تکیمل شده با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA برای مرحله استقرار استفاده کردند. مهمترین مشکل در این مرحله آلودگی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در اثر اکسیدشدن مواد فنلی می‌باشد.

[1] 6-benzylaminopurine or benzyladenine
[2] Indole-3-butyric acid
[3] Gibberellic acid
[4] α-naphthaleneacetic acid

۱ ٦ ۲ مرحله پرآوری[1]

موفقیت و سودمندی اقتصادی پروتوکل‌های ریزازدیادی به میزان زیادی وابسته به روش و میزان پرآوری شاخه دارد (دوبرانسکی و داسیلوا، ۲۰۱۰). در ریزازدیادی گلابی بیشترین اختلافات مربوط به مرحله پرآوری شاخه می‌باشد.کارآیی پرآوری شاخه در گلابی تحت تاثیر چندین فاکتور شامل، ژنوتیپ، نوع و غلظت فیتوهورمونها، ترکیب محیط غذایی، شرایط محیطی کشت، نوع ماده ژله‌ای کننده، وضعیت ریزنمونه‌ها و نوع سیستم کشت می‌تواند قرار گیرد.

هرچند بیشترین محیط غذایی استفاده شده در این مرحله محیط MS می‌باشد، با وجود این گزارشاتی در مورد برتری سایر محیط‌های غذایی نسبت به MS وجود دارد. بیل و لومبرک(۲۰۰۹) گزارش کرد که محیط DKW[2] و QL برای پرآوری شاخه ارقام بارتلت و بورباسک برتر از MS و WPM می‌باشد. شاخه‌ها روی WPM مقداری کلروز نشان‌دادند و همچنین شاخه‌های تشکیل‌شده روی QL خیلی کوتاه و باریک بودند. بانو و همکاران (۱۹۸۹) با مقایسه تاثیر سه نوع محیط MS،۱/۲MS و WPM برروی پرآوری شاخه شش رقم گلابی *P serotina* گزارش کردند که محیط WPM برای دو رقم *Nijisseiki* و *Osanijisseiki* و ۱/۲MSبرای چهار رقم بعدی بهتر می‌باشد. یو و همکاران (۱۹۹۵) محیط Cheng را برای پرآوری شاخه *P. communis,P. calleryana* و *P. betulifolia* نسبت به WPM برتر دانسته‌اند. انیرود و کانوار (۲۰۰۸) در ریزازدیادی گلابی*P. Pyrifolia* گزارش کردند که بیشترین تعداد شاخه در هر ریزنمونه روی محیط WPM بدست آمد، ولی طول شاخه‌های ایجاد شده روی محیط MS بیشتر بود. در رقم هوسوی نیز محیط WPM برای پرآوری شاخه بهتر از محیط MS بوده است (کادوتا وهمکاران ۲۰۰۱).

بیشترین ماده ژله‌ای کننده استفاده شده در پرآوری گلابی پودر آگار[3] با غلظت ٦ تا ۸ گرم در لیتر می‌باشد. غلظت و نوع ماده ژله‌ای کننده می‌تواند روی کمیت و کیفیت شاخه پرآوری شده تاثیر گذار

[1] Shoot multiplication
[2] Driver– Kuniyuki walnut
[3] Powder agar