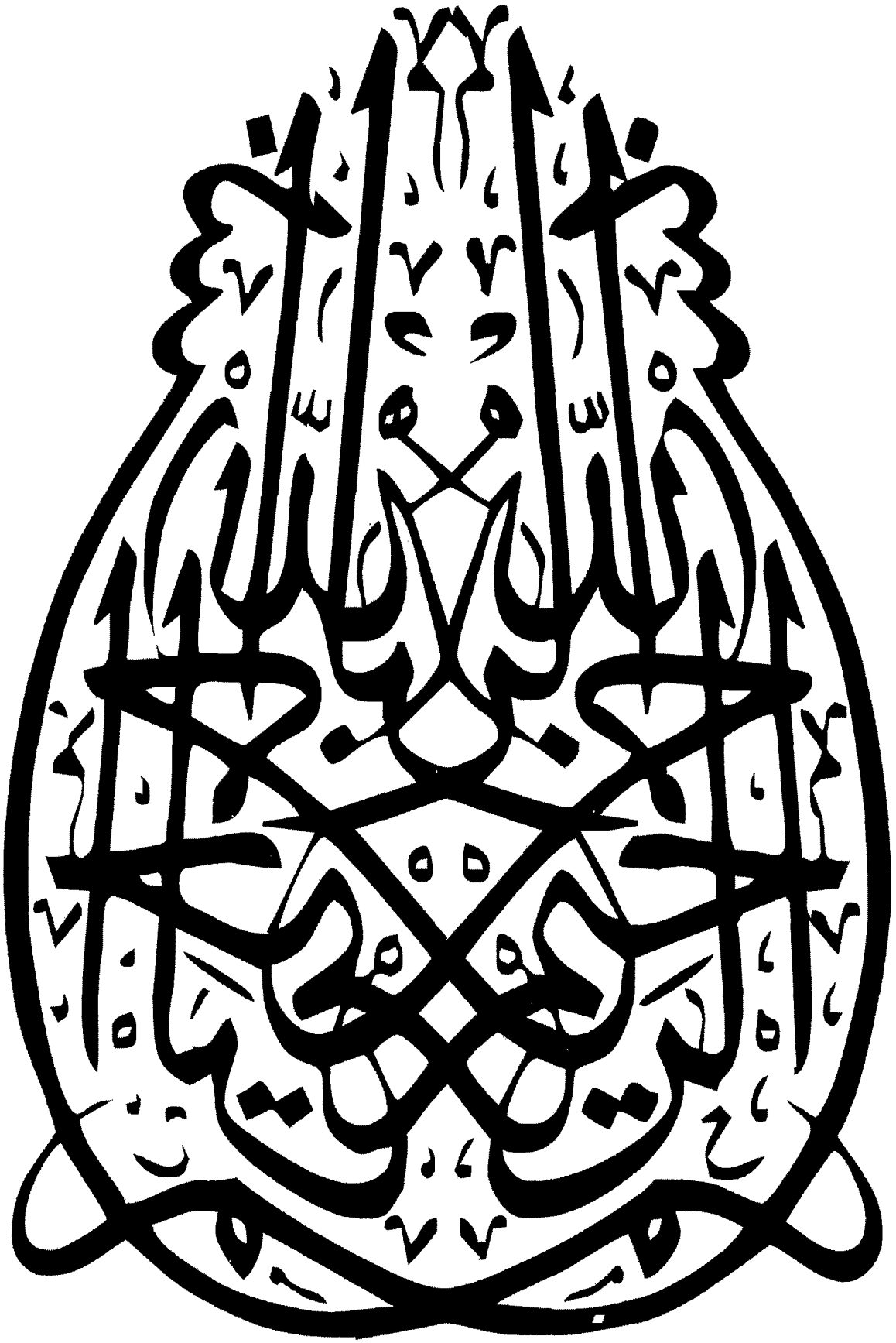


# دانشگاه پیام نور

**پایان نامه**

**برای دریافت درجه کارشناسی ارشد**

**در رشته علوم گیاهی**

## دانشگاه پیام نور مرکز نجف آباد

## گروه زیست شناسی

**عنوان پایان نامه:**

**اندام زایی مستقیم و غیر مستقیم گلابی وحشی** (*Pyrus glabra*)

**استاد راهنما: یوسف علی سعادت**

**استاد مشاور: مهدی یوسفی**

**نگارش: فاطمه دیلمی**

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
شعبه مرکزی

**دی ماه ۱۳۸۷**

۱۲۶۰۰۵

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

تاریخ: .....
شماره: ۰۳۱۲/.....
پیوست: .....

# دانشگاه پیام نور «مرکز نجف آباد»

باسمه تعالی

## تصویب پایان نامه / رساله

پایان نامه / رساله عنوان: **اندام زایی مستقیم وغیرمستقیم گلابی وحشی گونه Pyrus glabra**

که توسط خانم فاطمه دیلمی درمرکز نجف آباد تهیه وبه هیات داوران ارائه گردیده است مورد تائید میباشد.تاریخ دفاع : ۸۸/۰۲/۰۹ نمره : ۱۹/۷ درجه ارزشیابی: عالی

نوزده و هفت دهم

اعضاء هیات داوران:

| نام ونام خانوادگی | هیات داوران | مرتبه علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| دکتریوسف علی سعادت | استاد راهنما | استادیار پژوهشی | |
| دکتر مهدی یوسفی | استادراهنمای همکار | | |
| دکتر شکوفه انتشاری | داورداخلی | | |
| دکتر بهرام بانی نسب | داورخارجی | | |
| | نماینده تحصیلات تکمیلی | | |

نجف آباد - بلوار طالقانی کد پستی: ۸۵۱۵۶۴۳۱۴۴ دور نگار: ۲۷۲۷۱۲۴ تلفن: ۲-۲۷۲۷۱۲۱
نشانی اینترنتی: Http: //www.pnu3nc.ac.ir پست الکترونیکی: Najaf@pnu3.ac.ir

تقدیم به بهترین‌های زندگیم

**پدر و مادر مهربان**

**و**

**همسر فداکارم**

# سپاسگزاری

الهم عجل لولیک الفرج

حمد و سپاس یگانه نگارنده کتاب هستی را که با لطف بیکرانش این توفیق را ارزانی‌ام داشت تا بتوانم در راه ارتقای دانش خویش گامی بردارم. نگاشتن این دانش نامه داعیه شناخت علم نیست، بلکه نشانه دوست داشتن اوست. در هدف پرستش زیبایی و ره یافتن به سوی کمال بهتر دیدم که در تار و پود علم به جستجویش باشم.
دوستت دارم خدایم.

یا متین، سپاس تو را که جهت عنایت به این هدف مقدس در انجام پروژه و نگاشتن این رساله در خدمت استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر یوسف علی سعادت کسب فیض نمودم که کمال تشکر و سپاس را از لطف و محبت بی شائبه شان دارم و صمیمانه از جناب آقای مهندس نصیرزاده که طی انجام این پژوهش دلسوزانه یاری‌ام دادند و از تجارب ارزنده شان بهره مندم ساختند سپاسگزارم.
در پایان از ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس جناب آقای دکتر محمدنیا به جهت فراهم آوردن امکانات اجرای طرح سپاسگزاری می نمایم. همچنین از تمامی عزیزانی که صمیمانه در تمامی مراحل این پایان نامه یار و غم خوارم بودند، دوست عزیزم بدرالسادات موسوی، و همکاران پر تلاش آن مرکز سرکار خانم جوکار و آقایان، مهندس حاتمی، مهندس حمزه پور، نعمتی و کلیه مهربانانی که یاد وخاطرشان در ذهنم جاودانه است و کلام، گویای سپاسگزاری از لطف بی‌دریغشان نیست، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

**فاطمه دیلمی**

**زمستان۸۷**

## اندام زایی مستقیم و غیر مستقیم گلابی وحشی


### چکیده

یکی از رویشگاه‌های طبیعی گلابی وحشی (*Pyrus* sp.) در شهرستان سپیدان استان فارس واقع شده است. گونه اصلی و مهمترین آنها در این رویشگاه *Pyrus. glabra* Boiss. می باشد. به‌منظور بررسی امکان تکثیر این گونه با استفاده از تکنیک‌های کشت بافت این پژوهش انجام شد. در جنگلجهای طبیعی سپیدان چندین درخت شناسایی شده و سپس انتخاب شدند، میوه ها چیده شده و سپس بذرها از داخل آن خارج شدند و پس از گندزدایی به عنوان ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. محیط موراشیگی و اسکوگ (MS) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده توسط ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار برای تمامی آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفت. هیپوکلریت کلسیم ۱۲ درصد به مدت ۵۰ دقیقه و هیپوکلریت کلسیم ۱۵/۵ درصد درصد به مدت ۲۰ دقیقه و سپس سه مرتبه آبشویی با آب مقطر سترون جهت گندزدایی سطحی بذرها مناسب بوده است. اضافه کردن ۰/۶ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA به محیط غذایی برای استقرار و افزونش شاخساره بهینه بوده است. به منظور کالوس زایی قطعات برگی تولید شده در شرایط درون شیشه ای، بر روی محیط MS حاوی ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر BA و غلظت های مختلف 2,4-D کشت داده شدند و در شرایط تاریکی در اتاق رشد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. کالوس ها به محیط باززایی حاوی غلظت های مختلف BA و ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA به منظور تولید شاخساره نابجا انتقال داده شدند. بیشترین کالوس زایی و حداکثر وزن تر کالوس در محیط حاوی ۱/۵ میلی گرم در لیتر2,4-D مشاهده شد که بطور معنی داری نسبت به کالوس هایی که در محیط حاوی ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر2,4-D بودند، بیشتر بود. به منظور تولید شاخساره نابجا بطور مستقیم، قطعات برگی تولید شده در شرایط درون شیشه ای در محیط حاوی غلظت های مختلف BA و IBA کشت داده شدند، اما هیچ شاخساره نابجا تولید نشد. قطعات برگی و کالوس های تولید شده در شرایط درون شیشه ای در محیط های حاوی غلظت های مختلف TDZ و ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA برای تشکیل شاخساره نابجا کشت داده شدند. در این محیط ها تولید کالوس مشاهده شد اما شکل گیری شاخساره نابجا صورت نگرفت.



کلمات کلیدی: شاخساره نابجا، کالوس زایی، محیط موراشیگی و اسکوگ (MS)، افزونش شاخساره.

# فهرست مطالب


**۱-کلیات**

**۱-۱- مقدمه** ..... ۱

**۱-۲- مروری بر پژوهش های پیشین** ..... ۵

۱-۲-۱- ریزنمونه های مورد استفاده ..... ۵

۱-۲-۲- محیط کشت ..... ۶

۱-۲-۳- گندزدایی ریزنمونه‌ها ..... ۷

۱-۲-۴- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی ..... ۸

۱-۲-۵- افزونش شاخساره ..... ۹

۱-۲-۶- ایجاد کالوس به منظور اندام‌زایی ..... ۹

**۱-۲-۷- ریشه‌زایی** ..... ۱۱

**۲- مواد و روشها**

الف- مواد گیاهی ..... ۱۴

ب- محیط کشت ..... ۱۴

ج- سترون کردن ..... ۱۴

د- آماده سازی اولیه مواد گیاهی ..... ۱۵

و- گندزدایی سطحی مواد گیاهی ..... ۱۵

**آزمایش ۲-۱-** تاثیر غلظت‌های مختلف کلراکس در گندزدایی سطحی بذور *Pyrus glabra* ..... ۱۶

**آزمایش ۲-۲-** تاثیر حذف لپه در کنترل آلودگی بذر *Pyrus glabra* ..... ۱۶

**آزمایش ۲-۳-** تاثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت کلسیم در کنترل آلودگی بذر *Pyrus glabra* ..... ۱۷

**آزمایش ۲-۴-** تاثیر زمان‌های مختلف گندزدایی سطحی بذور *Pyrus glabra* توسط هیپوکلریت کلسیم ۱۲ درصد روی کنترل آلودگی باکتریایی. ..... ۱۸

**آزمایش ۲-۵-** تاثیر غلظت های مختلف BA بر روی افزونش شاخساره در *Pyrus glabra* ..... ۱۸

**آزمایش ۲-۶-** تولید کالوس از لپه های بذر *Pyrus glabra* ..... ۱۹

**آزمایش ۲-۷-** تاثیر غلظت های مختلف 2,4-D با استفاده از ریزنمونه برگ *Pyrus glabra* ..... ۲۰

**آزمایش ۲-۸-** تولید کالوس از بذر *Pyrus glabra* ..... ۲۰

**آزمایش ۲-۹-** تاثیر غلظت های مختلف BA و IBA بر روی تولید شاخساره از ریزنمونه برگ *Pyrus glabra*..... ۲۱
**آزمایش ۲-۱۰-** تاثیر غلظت های مختلف BA و IBA بر روی تولید شاخساره نابجا از ریزنمونه برگ همراه با دمبرگ در *Pyrus glabra*..... ۲۱
**آزمایش ۲-۱۱-** تاثیر غلظت های مختلف TDZ بر روی تولید شاخساره نابجا با استفاده از ریزنمونه برگ *Pyrus glabra*..... ۲۲
**آزمایش ۲-۱۲-** تاثیر غلظت های مختلف BA بر روی ایجاد شاخساره نابجا با استفاده از کالوس‌های برگ و لپه *Pyrus glabra*..... ۲۳
**آزمایش ۲-۱۳-** تاثیر غلظت های مختلف TDZ بر روی ایجاد شاخساره نابجا با استفاده از کالوس‌های لپه *Pyrus glabra*..... ۲۳
**آزمایش ۲-۱۴-** تاثیر غلظت های مختلف BA و محیط کشت WPM دارای ویتامین های محیط SH بر روی ایجاد شاخساره نابجا با استفاده از کالوس‌های برگ و لپه در *Pyrus glabra*..... ۲۴

**۳- نتایج و بحث**..... **۲۵**
**آزمایش ۳-۱-** تاثیر غلظت‌های مختلف کلراکس در گندزدایی سطحی بذور *Pyrus glabra*..... ۲۵
**آزمایش ۳-۲-** تاثیر حذف لپه در کنترل آلودگی بذر *Pyrus glabra*..... ۲۶
**آزمایش ۳-۳-** تاثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت کلسیم در کنترل آلودگی بذر *Pyrus glabra*..... ۲۶
**آزمایش ۳-۴-** تاثیر زمان‌های مختلف گندزدایی سطحی بذور *Pyrus glabra* توسط هیپوکلریت کلسیم ۱۲ درصد روی کنترل آلودگی باکتریایی..... ۲۷
**آزمایش ۳-۵-** تاثیر غلظت های مختلف BA بر روی افزونش شاخساره در *Pyrus glabra*..... ۲۸
**آزمایش ۳-۶-** تولید کالوس از لپه های بذر *Pyrus glabra*..... ۳۰
**آزمایش ۳-۷-** تاثیر غلظت های مختلف 2,4-D با استفاده از ریزنمونه برگ *Pyrus glabra*..... ۳۰
**آزمایش ۳-۸-** تولید کالوس از بذر *Pyrus glabra*..... ۳۱
**آزمایش ۳-۹-** تاثیر غلظت های مختلف BA و IBA بر روی تولید شاخساره از ریزنمونه برگ *Pyrus glabra*..... ۳۳
**آزمایش ۳-۱۰-** تاثیر غلظت های مختلف BA و IBA بر روی تولید شاخساره نابجا از ریزنمونه برگ همراه با دمبرگ در *Pyrus glabra*..... ۳۶

**آزمایش ۳-۱۱-** تاثیر غلظت های مختلف TDZ بر روی تولید شاخساره نابجا با استفاده از ریزنمونه برگ *Pyrus glabra*..... ۳۷
**آزمایش ۳-۱۲-** تاثیر غلظت های مختلف BA بر روی ایجاد شاخساره نابجا با استفاده از کالوس‌های برگ و لپه *Pyrus glabra* ..... ۴۰
**آزمایش۳-۱۳-** تاثیر غلظت های مختلف TDZ بر روی ایجاد شاخساره نابجا با استفاده از کالوس‌های لپه *Pyrus glabra* ..... ۴۱
**آزمایش ۳-۱۴-** تاثیر غلظت های مختلف BA و محیط کشت WPM دارای ویتامین های محیط SH بر روی ایجاد شاخساره نابجا با استفاده از کالوس‌های برگ و لپه در *Pyrus glabra*..... ۴۲
**نتیجه گیری کلی** ۴۳
**پیشنهادات** ۴۳
**منابع** ۴۴

# فهرست جداول

**جدول۳-۱**- تاثیر غلظت‌های مختلف کلراکس بر روی استقرار کشت های درون شیشه ای گلابی وحشی (*Pyrus glabra*)..... ۲۵

**جدول۳-۲**- تاثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت کلسیم بر روی استقرار کشت های درون شیشه ای گلابی وحشی (*Pyrus glabra*)..... ۲۶

**جدول ۳-۳**- تاثیر زمان های مختلف گندزدایی توسط هیپوکلریت کلسیم ۱۲ درصد بر روی استقرار کشت های درون شیشه ای گلابی وحشی (*Pyrus glabra*)..... ۲۷

**جدول۳-۴**- تاثیر غلظت‌های مختلف BA بر روی رشد درون شیشه‌ای شاخساره‌های انتهایی گلابی وحشی (*Pyrus glabra*)..... ۲۸

**جدول ۳-۵**- تاثیر غلظت های مختلف 2,4-D در تولید کالوس از برگ گلابی وحشی (*Pyrus glabra*) در تاریکی پس از ۴۵ روز ..... ۳۱

**جدول ۳-۶**- تاثیر غلظت های مختلف 2,4-D در تولید کالوس از لپه گیاه گلابی وحشی (*Pyrus glabra*) در تاریکی پس از ۴۵ روز ..... ۳۲

**جدول ۳-۷**- تاثیر غلظت های مختلف BA و IBA بر روی درصد زنده ماندن ریزنمونه ها در شرایط درون شیشه ای در *Pyrus glabra*..... ۳۵

**جدول ۳-۸** تاثیر غلظت های مختلف BA و IBA بر روی درصد زنده ماندن ریزنمونه ها در *Pyrus glabra*..... ۳۶

**جدول ۳-۹**- تاثیرغلظت‌های مختلف TDZ بر روی تولید کالوس از برگ گلابی وحشی (*Pyrus glabra*) درروشنایی بر روی محیط کشت MS پس از ۳۰ روز..... ۳۸

**جدول ۳-۱۰**- تاثیرغلظت های مختلف TDZ بر روی کالوس زایی برگ گلابی وحشی (*Pyrus glabra*) درتاریکی بر روی محیط کشت MS پس از ۳۰ روز..... ۳۹

# فهرست اشکال

**شکل ۱**- جنگل های منطقه سپیدان با پوششی از *Pyrus glabra* و دیگر گیاهان منطقه. ..... ۲

**شکل ۲**- تک درخت گلابی وحشی *Pyrus glabra* در جنگل های شهرستان سپیدان..... ۳

**شکل ۳**- برگ و میوه درخت *Pyrus glabra*..... ۳

**شکل ۴**- تولید شاخساره از بذر *Pyrus glabra* در محیط کشت MS دارای ۰/۶ میلی گرم در لیتر BA و ۰/۰۱ میلی گرم در لیترIBA.. ..... ۲۹

**شکل ۵**- کالوس تولید شده از کشت لپه *Pyrus glabra* بر روی محیط کشت دارای ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر BA و غلظت های مختلف IBA بعد از ۳۰ روز. (a- ۰/۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D، b- ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D، c- ۱/۰ میلی گرم در لیتر 2,4-D، d- ۱/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D)..... ۳۳

**شکل ۶**- کالوس تولید شده از کشت برگ *Pyrus glabra* بر روی محیط کشت دارای ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و غلظت های مختلف TDZ بعد از ۳۰ روز. (a- ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر TDZ، b- ۰/۱ میلی گرم در لیتر TDZ، c- ۰/۲ میلی گرم در لیتر TDZ، d- ۰/۵ میلی گرم در لیتر TDZ). ..... ۴۰

**شکل ۷**- رشد کالوس های حاصل از برگ *Pyrus glabra* بر روی محیط کشت دارای ۰/۲ میلی گرم در لیتر NAA و ۱/۰ میلی گرم در لیتر TDZ..... ۴۲

# فصل اول

# کلیات

## ۱-۱- مقدمه

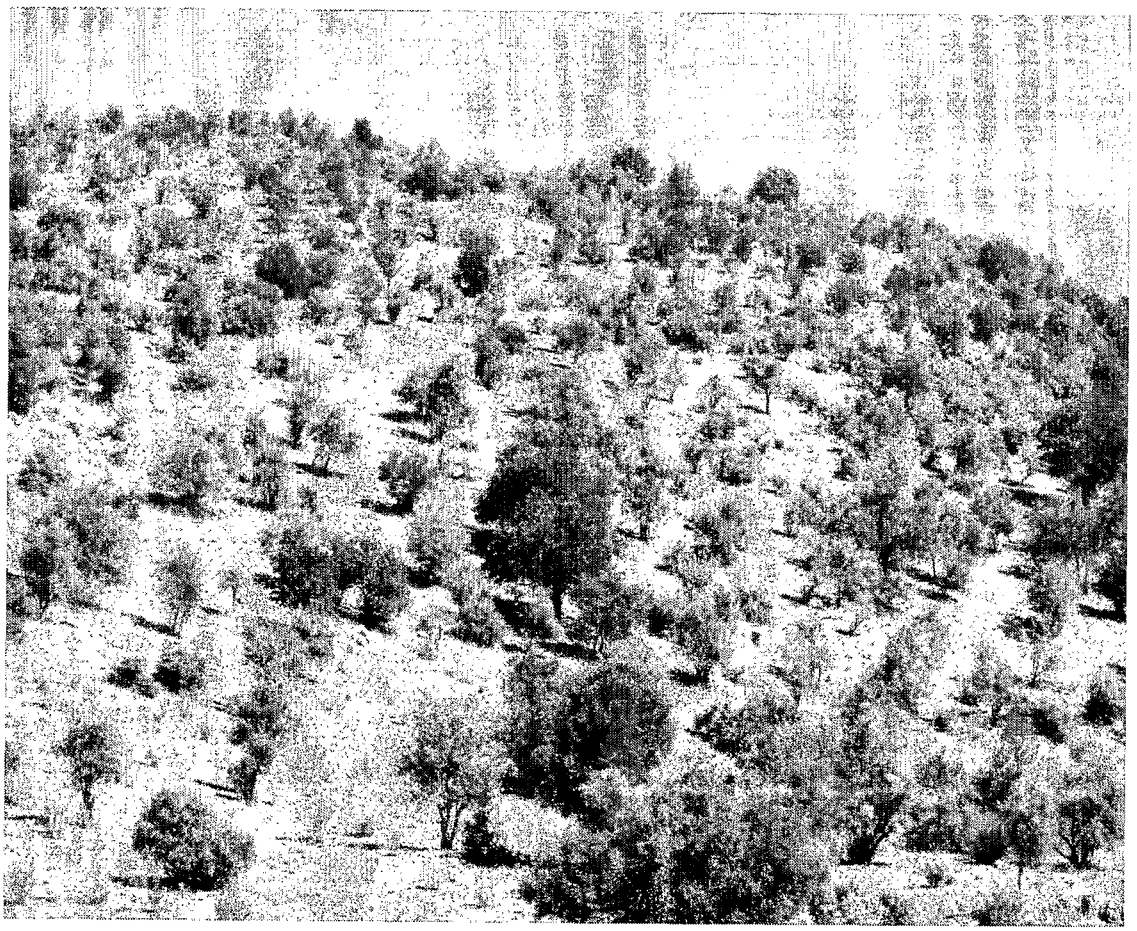
گلابی یکی از قدیمی‌ترین و مهمترین درختان میوه است که به‌طور وسیعی در مناطق معتدله و سردسیری جهان رشد می‌کند. (Jackson, 2003). جنس گلابی (*Pyrus*) از میوه‌های دانه‌دار متعلق به تیره Rosaceae و زیر تیره Maloideae می‌باشد. در این جنس حدود ۲۲ گونه مختلف وجود دارد که نیمی از آنها بومی اروپا، آفریقای شمالی و آسیای صغیر در اطراف مدیترانه و نیم دیگر بومی آسیا می‌باشند. بیش از ۱۶ گونه گلابی از آسیا منشا گرفته اند. منطقه Mainland چین مرکز منشا بیشتر گلابی‌های آسیایی می‌باشد.

ایران با دارا بودن بیش از ده گونه گلابی یکی از مهمترین منابع ژنتیکی آن در دنیا محسوب می گردد و یکی از مناطق مهم تنوع ژنتیکی گونه‌های گلابی وحشی می باشد (خاتم ساز، ۱۳۷۱).

استان فارس دارای مساحتی بالغ بر ۱۳ میلیون هکتار است که در حدود ۳ میلیون هکتار آن را جنگل‌های طبیعی تشکیل می‌دهد که در این جنگل‌ها به دلیل تنوع شدید آب و هوایی موجود در سرتاسر استان، جوامع متنوعی از درختان و درختچه‌ها و گیاهان بوته‌ای و علفی قابل رویت است. یکی از گونه‌های درختی مهم که به لحاظ منحصر به فرد بودن رویشگاه آن در فارس و همین‌طور نقش اقتصادی آن در معیشت روستائیان و عشایر منطقه دارد، گونه‌ای از گلابی وحشی به نام انچوچک با نام علمی *Pyrus glabra* Boiss. (Schonbeck-Temesy, 1975) می‌باشد که به همراه آن پایه‌هایی از گونه دیگر این جنس به نام هرمو با نام علمی *Pyrus syriaca* Boiss. (Schonbeck-Temesy, 1975) به صورت پراکنده دیده می‌شوند (حمزه پور، ۱۳۸۷).

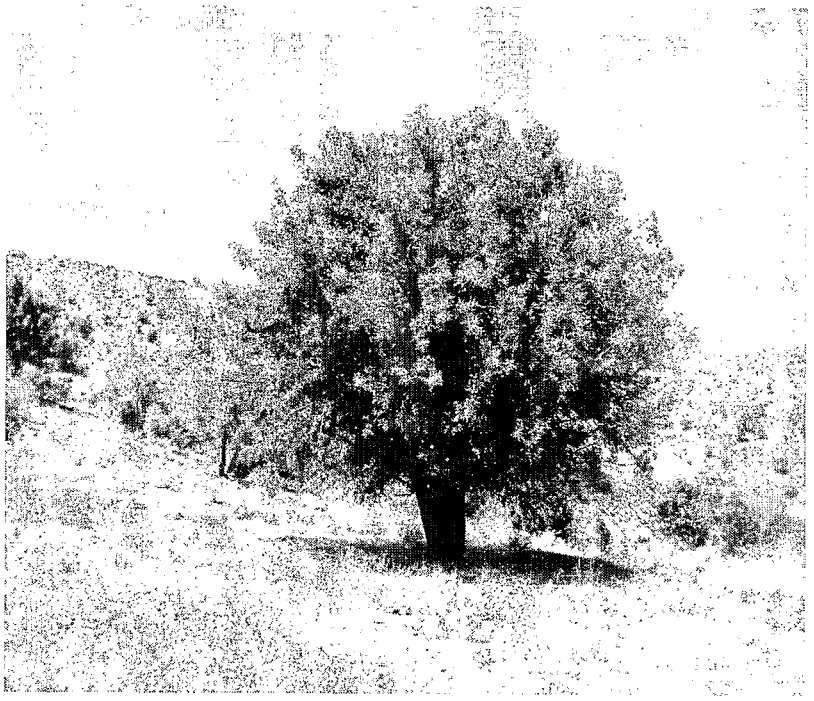
رویشگاه گلابی وحشی در استان فارس وسعتی در حدود ۳۵۰۰۰ هکتار را در بر می‌گیرد که در حدود ۳۰۰۰۰ هکتار آن در حوزه شهرستان سپیدان واقع شده است (شکل ۱)، که از جنبه‌های اکولوژیکی و همچنین تولید میوه و استحصال بذر به عنوان محصول فرعی جنگل در خور توجه می باشد. در این رویشگاه علی‌رغم وجود پایه‌های مناسب و سالم با بذردهی خوب، آثاری از تجدید حیات به‌وسیله بذر به چشم نمی‌خورد و فقط در برخی عرصه‌ها به لحاظ قرق (ذخیره گاه گلابی وحشی) یا عدم دسترسی انسان و دام که عملا از تعرض مصون مانده‌اند، تجدید حیات اندکی با رویش ریشه جوش‌های حاصل از درختان موجود صورت گرفته است. وجود چنین رویشگاه‌های نادر و عمدتا فاقد زادآوری به‌جهت بهره برداری از بذر درختان و یا فرسایش شدید خاک و حضور دام در عرصه، زنگ خطری است که لزوم توجه به این عرصه‌ها و بررسی شرایط رویشگاهی موجود را به‌منظور چاره اندیشی در ارتباط با نحوه پایداری و استمرار بقاء گونه‌های با ارزش، یادآور

می‌گردد. به همین دلیل است که استفاده از روش‌های ریزازدیادی به‌منظور تکثیر گونه‌های گلابی وحشی مورد توجه قرار می‌گیرد.

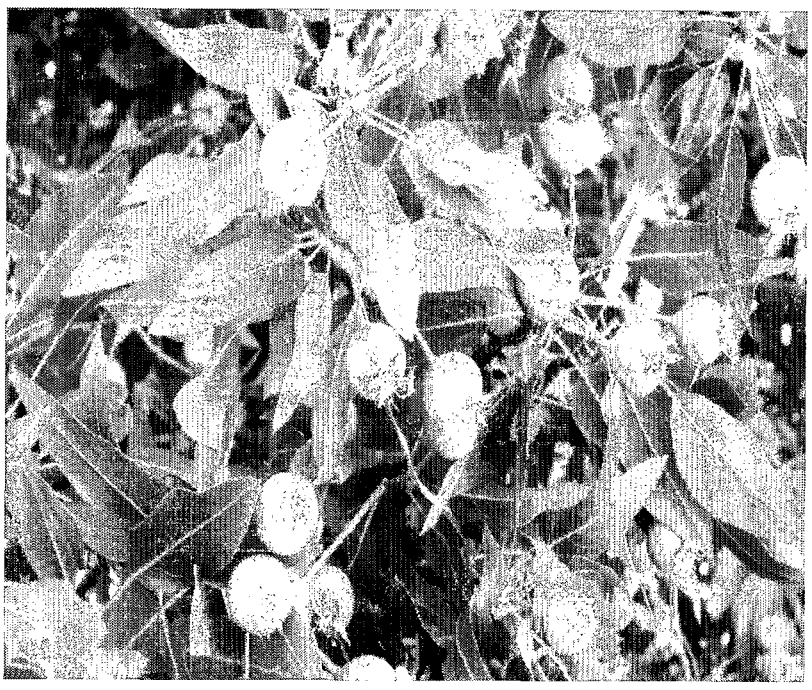


شکل ۱- جنگل‌های منطقه سپیدان با پوششی از (*Pyrus glabra*) و دیگر گیاهان منطقه

گلابی وحشی یا انچوچک درختی است کوچک که ارتفاع آن به ۶ متر بالغ می‌گردد (شکل ۲). انشعابات آن گاهی خار مانند، شاخه‌های آن صاف و خاکستری، جوانه‌ها دارای حاشیه مژه دار و برگ‌ها باریک و کشیده و نیزه‌ای با قاعده گرد یا گوه‌ای، سطح آن صاف و رنگ برگ‌ها سبز زیتونی می‌باشد.گل‌ها کوچک و سفید رنگ، میوه کروی به رنگ قهوه ای روشن به ابعاد ۲/۵-۱/۵ سانتی‌متر و پایکدار می باشد (شکل ۳).



شکل۲- تک درخت گلابی وحشی (*Pyrus glabra*) در جنگل‌های شهرستان سپیدان



شکل۳- برگ و میوه درخت *Pyrus glabra*

ازدیاد ارقام گلابی معمولا توسط پیوند روی پایه بذری گلابی معمولی (*Pyrus communis* L.) یا پایه کلونی به (*Cydonia oblonga* L.) و یا گونه‌های دیگر گلابی که خود توسط قلمه یا خوابانیدن تکثیر می‌شوند، صورت می‌گیرد (Al-Maarri *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1990). این فرایند علی‌رغم وابسته بودن به فصول خاصی از سال، نیازمند صرف زمان طولانی، تسهیلات خزانه‌ای زیاد و مهارت‌های فردی ویژه می باشد (Al-Maarri *et al.*, 1994). از طرفی گزارش شده که ریشه‌زایی قلمه‌های چوب سخت یا نرم گلابی با وجود اعمال تیمارهای هورمونی مختلف به سختی صورت می‌گیرد (Arzani, 2002; Fadl and Hartmann, 1967) و یا اصلا امکانپذیر نیست (Shibli *et al.*, 1997). با توجه به محدودیت‌های فوق استفاده از شیوه‌های نوین ریزازدیادی[1] به‌منظور تکثیر انبوه ارقام برتر اجتناب ناپذیر به‌نظر می‌رسد. استفاده از شیوه‌های کشت بافت[2] به‌منظور تکثیر تجاری ارقام درختان میوه از چند دهه اخیر آغاز شده و در حال حاضر در بسیاری از گونه‌ها مکمل شیوه‌های مرسوم ازدیاد به‌شمار می‌آید. دلایل بسیاری برای توسعه روش ریزازدیادی در درختان میوه وجود دارد، از جمله اینکه امکان تولید نهال در تمام فصول سال، در کوتاه‌ترین زمان و در کمترین فضای رشد امکانپذیر می‌شود و به تبع آن هزینه تولید نهال کاهش می‌یابد. ضمن آنکه به ازدیاد سریع ارقام گیاهان وارداتی، پس از خروج آنها از دوره قرنطینه کمک می‌کند (Bhojwani *et al.*, 1984).

در این راستا در این پژوهش امکان اندام‌زایی انچوچک به روش‌های مستقیم و غیر مستقیم صورت گرفته است.

1. Micropropagation
2. Tissue culture

## ۱-۲- مروری بر پژوهش های پیشین

توانمندی‌های تکنیک ریزازدیادی جهت تکثیر درختان میوه توسط چندین گروه تحقیقاتی در دانشگاهها و مراکز تحقیقاتی، در نقاط مختلف دنیا از چند دهه اخیر آغاز شده و در حال حاضر در بسیاری گونه‌ها مکمل شیوه‌های مرسوم ازدیاد به‌شمار می‌رود.

### ۱-۲-۱- ریزنمونه های مورد استفاده

Chevreau و همکاران (۱۹۸۹) گزارش نموده‌اند که در پژوهش‌های خود از برگ‌های حاصل از شاخساره‌های تکثیر شده در محیط درون شیشه‌ای به‌منظور دستیابی به کالوس استفاده نمودند. Kumari و همکارانش (۲۰۰۳) که برای اندام‌زایی مستقیم از برگ‌های گرفته شده از جوانه‌های انتهایی شاخساره های رشد یافته در محیط درون شیشه‌ای گونه *Pyrus pyrifolia* استفاده کرده بودند، گزارش کردند که قسمت‌های پایینی برگ (Basal)، برای باززایی مناسب‌تر هستند. ایشان بیان نمودند که این امر، به‌دلیل حضور تعداد بیشتر بافت‌های آوندی در این ناحیه می‌باشد. به‌منظور تولید یک گیاه کامل از بافت‌های مختلف گیاه از جمله، پروتوپلاست‌های مزوفیل برگ گیاه *Pyrus communis* L. (Ochatt and Power, 1988; Ochatt and Caso, 1989)، از لپه بذر (Browning *et al.*, 1987) همچنین از کالوس‌های حاصل از هسته و رویان نابالغ گیاه و کالوس‌های جوانه نیز استفاده شده است (Mehra and Jaidka, 1979,1985). باززایی شاخساره‌ها از لپه و محورهای رویانی *Pyrus Pyrifolia* نیز گزارش شده است (Banno *et al.*, 1992; Hiratsuka and Kataguri, 1988).

Viseur (1987) اعلام نمود که برای آزمایش‌های خود از نهال‌های یک ساله‌ای که برروی درختان گلابی (رقم‌های Durondeau، Doyenne Ducomice Conference, Professeur Molon) در ابتدای بهار استقرار یافته‌اند، استفاده کرده و این نهال‌ها قبل از استفاده به‌مدت ۱ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند. Abdollahi و همکاران (۲۰۰۶) برای تولید کالوس وسپس باززایی شاخساره‌های نابجا، از برگ‌های گونه *Pyrus communis* L. استفاده کردند. ایشان بیان نمودند که استفاده از برگ‌های بالغ کاملا توسعه یافته و همچنین استفاده از ریزنمونه‌های برگی حاصل از شاخساره‌های ریشه‌دار، درصد باززایی و تعداد شاخه‌ها را افزایش می‌دهد. Lane و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که

استفاده از برگ‌های بالغ گیاه که در قسمت پایینی آن قرار دارند نسبت به برگ‌های انتهایی که جوانترند درصد باززایی را افزایش می‌دهد.

Kumar و همکارانش (۲۰۰۸) گزارش نمودند که به‌منظور باززایی شاخساره‌های نابجا *Pyrus* spp. از برگ‌های کاملا سالم همراه با دمبرگ، که قبلا به‌مدت ۴ هفته شاخساره‌های آنها در محیط تکثیر قرار داشتند استفاده نمودند. همچنین باززایی درختان میوه معتدله برای ریزنمونه‌های مختلف مانند، پروتوپلاست‌های گلابی و گیلاس توسط Ochatt و همکاران (۱۹۸۷) و همچنین از برگ درخت سیب و گلابی به‌وسیله Lablay و همکاران (۱۹۹۱) گزارش شده است.

### ۱-۲-۲- محیط کشت

پژوهشگران زیادی از محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (MS) (Murashige and skoog, 1962) و همچنین محیط کشت ویژه گردو (DKW)[1] (Mc Granaha *et al.*, 1987) و محیط کشت LP (Lepoivre and Quoirin, 1977) به‌میزان کمتر استفاده کرده‌اند. رایج‌ترین محیط کشت برای گیاهان علفی و چوبی محیط کشت MS می‌باشد. ضمن اینکه سایر محیط‌های کشت مانند DKW، SH (Schenk and Hildebrandt, 1972)، WPM[2] (Lloyd and McCown, 1981) ، B5 (Gamborg *et al.*, 1968) و LS (Linsmair and Skoog, 1965) هم در کشت بافت گیاهان علفی کاربرد فراوان دارند. محیط کشت MS ، به‌دلیل اینکه بسیاری از گیاهان، به آن واکنش مناسبی نشان داده‌اند، بسیار معمول می‌باشد ولی همیشه ایده آل نیست زیرا میزان نمک در آن بالاست (Hartman, 1990 ). برای استقرار زیرنمونه‌های گلابی استفاده از محیط کشت MS با نصف غلظت نمک‌های ماکرو (۱/۲MS) توسط Baviera و همکاران (۱۹۸۹) گزارش شده است. همچنین ایشان بیان نمودند که برای نیمه جامد کردن محیط کشت از دیفکوباکتوآگار[3] و به‌ندرت از gellan gum استفاده شده است ولی دو فاز مایع بر روی جامد بر اساس تکنیک تعلیق در مایع، به‌طور گسترده تکثیر نونهال را افزایش می‌دهد و برای ازدیاد تجارتی گلابی در ایالات متحده به‌طور گسترده استفاده می‌شود. Viseur (1987) برای ریشه‌زایی گلابی *Pyrus communis* L. از محیط کشت MS با نصف غلظت

1. Driver and Kuniyoki walnut medium
2 Woody plant medium
3. Difco bacto agar

ماکروالمنت‌ها و میکروالمنت‌های محیط Nitsch-Nitsch (Nitsch and Nitsch, 1969) و ویتامین‌های محیط Jacquiot (Gautheret, 1959) و همچنین آمینواسیدهای محیط Margara (Margara, 1980) به‌علاوه ۲ درصد ساکارز تشکیل شده است.

### ۱-۲-۳- گندزدایی ریزنمونه‌ها

گندزدایی سطحی، عوامل بیماری‌زا شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها را از سطح ریزنمونه‌ها از بین می‌برد. مواد گندزدای اولیه شامل الکل اتیلیک ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم می‌باشد. برای از بین بردن قارچ‌ها از قارچ‌کش‌های مختلف از جمله بنومیل و مرکاپتان استفاده می‌شود ولی برای مبارزه با باکتری‌ها از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود (Pierik, 1997; Hartman, 1990).

Druart (1980) برای گندزدایی سطحی ریزنمونه‌های گلابی از الکل اتانول ۹۴ درصد به‌مدت ۵ دقیقه، سپس هیپوکلریت‌کلسیم ۹ درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه استفاده نمود. این در حالی است که Abdollahi و همکاران (۲۰۰۶) گزارش نموده‌اند که افزودن سفوتاکسیم و وانکومایسین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت از رشد باکتری‌های داخلی جلوگیری می‌کند.

Kumar و همکاران (۲۰۰۸) به‌منظور گندزدایی شاخه‌ها برای کشت در محیط از کلرور جیوه [1] ۰/۱ درصد به‌مدت ۷ دقیقه والکل اتیلیک ۷۵ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه استفاده نمودند. Lane و همکاران (۱۹۹۸) گزارش نمودند که کلراکس ۵ درصد و ۰/۱ درصد توین [2] ۲۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه برای گندزدایی سطحی ریزنمونه‌ها مناسب است. لازم به ذکر است که نتایج مختلفی پیرامون نقش کانامایسین با غلظت‌های مختلف در جلوگیری از باززایی بر حسب نوع ژل، به‌دست آمده است ولی Chevreau و همکاران (۱۹۸۹) ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از این ماده را به هنگام استفاده از فیتاژل مفید دانسته اند.

1. $Hgcl_2$
2. Tween 20

### ۱-۲-۴- تنظیم کننده‌های رشد گیاهی

سایتوکاینین بنزیل آمینوپیورین (BAP)[1] مورد استفاده بیشتر پژوهشگران در زمینه کشت درون شیشه‌ای گیاه گلابی بوده است اما از زآتین[2] و 2ip[3] نیز استفاده شده است. 2ip و BA با یک غلظت پائین در کیفیت برگ و طویل شدن شاخساره‌ها بسیار موثر می‌باشد (Bell and Reed, 2002). افزونگری درون شیشه‌ای شاخساره‌های گلابی می‌تواند در محیط کشت شامل فقط BA انجام شود (Lane, 1979).

Hirabayashi و همکارانش (۱۹۸۷) با کشت سرشاخه‌های جوان دو گونه *Pyrus pyrifolia* و *Pyrus communis* اظهار داشتند که میزان اثر BA به همراه اسید نفتالین استیک (NAA)[4] یا اسید جیبرلیک ($GA_3$)[5] بر روی پرآوری، با زمانی که BA به تنهایی به‌کار می‌رود، برابر بوده است. ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر BA به ترتیب بیشترین میزان وزن و تعداد جوانه‌های پرآور شده را در *Pyrus pyrifolia* و به‌طور مشابهی در *Pyrus communis* داشته است.

گزارش شده که افزایش یک میلی‌گرم در لیتر BA به محیط کشت برای استقرار و شاخه‌زایی گلابی کافی است، اما مقدار آن بر اساس نوع گونه و رقم گلابی می‌تواند تغییر یابد. به‌عنوان مثال برای رقم گلابی ویلیامز افزودن ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت برای شاخه‌زایی کافی است و غلظت بیشتر آن باعث ناهنجاری در فرم برگ‌ها می‌شود. همچنین گزارش شده که غلظت مطلوب BA برای شاخه‌زایی *Pyrus calleryana* به‌میزان ۰/۵ میلی گرم در لیتر بوده است (Berardi *et al.*, 1993).

kumar و همکارانش (۲۰۰۸) گزارش کردند که ترکیب بین تی‌دیازورون (TDZ)[6] و NAA دارای یک اثر مهم بر تعداد شاخه‌های باززا شده در ۵ واریته از گلابی چینی می‌باشد. Viseur (1987) جهت ریشه‌زایی گونه *Pyrus communis* L. از ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده نمود.

1. 6- Benzylaminopurine
2. Zeatin
3. 2-isopentyladenine
4. α-Naphthaleneacetic acid
5. Gibberellin $A_3$ acid
6. Thidiazuron