مجله علوم باغباني ايران
دوره ۴۰، شماره ۲، ۱۳۸۸ (۹۱-۸۳)

ريز ازديادي چهار رقم گلابي (*Pyrus communis* L.) (درگزي، نطنزي، شاه ميوه و ويليامز)

سيد ضياء نصرتي[1]*، ذبيح‌الله زماني[2] و مصباح بابالار[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوي سابق كارشناسي ارشد، دانشيار و استاد، پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
(تاريخ دريافت: ۸۶/۵/۱۰- تاريخ تصويب: ۸۷/۴/۱۲)

چكيده

به منظور بررسي ريزازديادي چهار رقم گلابي، سه آزمايش مجزا انجام شد. در آزمايش اول اثر چهار نوع محيط كشت (**MS, MS/2, MSN/2 and MQL**) روي صفاتي مثل طول شاخه، تعداد شاخه و رنگ برگ مورد مقايسه قرار گرفت. محيط كشت **MS/2** و **MSN/2** به ترتيب بيشترين ميزان پرآوري شاخه و بلندترين شاخه‌ها را توليد نمودند. محيط كشت **MS** در مقايسه با **MSN/2** برگ‌هاي توسعه يافته‌تري ايجاد نمود و محيط كشت **MQL** باعث زردي مفرط برگ‌ها و كاهش رشد گرديد. به منظور ارزيابي دقيق‌تر محيط‌هاي كشت (در آزمايش دوم) ۱۰ نوع محيط كشت شامل محيط‌هاي قبلي به اضافه تغيير يافته‌هاي آنها مورد آزمايش قرار گرفت و صفت اندازه برگ نيز اندازه‌گيري شد. بر اساس نتايج بدست آمده از آزمايش اول و آزمايش دوم، برتري محيط كشت **MS/2** از بقيه محيط‌هاي كشت مشخص شد. آزمايش سوم، به منظور بررسي اثر غلظت **BA** و نوع اكسين بر پرآوري شاخه در ارقام مورد ارزيابي با استفاده از محيط كشت پايه **MS/2** انجام شد. ارقام شاه ميوه و درگزي در غلظت ۲ ميلي‌گرم در ليتر و ارقام ويليامز و نطنزي در غلظت ۳ ميلي‌گرم در ليتر بيشترين ميزان پرآوري شاخه را نشان دادند. غلظت يكسان **IBA** و **NAA** (۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر) در تركيب با **BA** نشان داد كه اثر **IBA** بر طول شاخه بيشتراز **NAA** بود.

واژه‌هاي كليدي: گلابي، كشت بافت، ازدياد درون شيشه‌اي، ازدياد رويشي، پرآوري شاخه.

مقدمه

گلابي يا گلابي اروپايي (*Pyrus communis* L.) متعلق به خانواده رز[1] مي‌باشد. ارقام گلابي به دليل هتروزيگوسي[2] بالا، معمولاً روي پايه‌هاي بذري همين گونه و يا همگروه‌هاي درخت به، پيوند مي‌شوند. اما پايه‌هاي به با همه ارقام گلابي سازگاري ندارند (Al-Maarri et al., 1994). از طرفي، ازدياد ارقام گلابي از طريق قلمه چوب نرم و سخت نيز به دليل ريشه‌زايي ضعيف آنها مشكل است (Al–Maarri et al., 1994; Hildebrandt & Harney, 1988; Viseur, 1987). يافته‌هايي در مورد ريشه‌زايي مستقيم قلمه با استفاده از سيستم مه‌افشان و هورمون اسيد ايندول بوتيريک در برخي از گونه‌هاي گلابي گزارش شده است (Bell et al., 1996; Al–Maarri et al., 1994; Shibli et al., 1997; Brardi et al., 1993).

روش‌هاي كلاسيك تكثير رويشي گلابي، بعلت وابستگي به فصـول خاصي از سال، آلودگي‌هاي ويروسي و نياز به مهارت خاص، با روش‌هاي نوين تكثير در محيط استريل جايگزين شده‌اند (Zimmerman et al.,1995).

1. Rosaceae
2. Heterozygocy

* نويسنده مسئول: سيد ضياء نصرتي تلفن: ۰۹۱۲-۳۲۷۰۶۵۰ E-mail: znosrati@ut.ac.ir

براي ريز ازدیادي گلابي، محيط كشت MS (Murashige & Skoog, 1962) به صورت پايه يا با اندكي تغيير و محيط كشت LP (۲۱) و DKW[1] به صورت جامد، مايع و يا غوطه‌ورسازي موقت پيشنهاد شده است (Bell & Reed, 2002). Roozban et al. (2003) محيط كشت WPM[2] را به عنوان بهترين شرايط براي مرحله استقرار پنج رقم گلابي آسيايي به همراه يك ميلي گرم در ليتر BAP معرفي نمودند. در حاليكه محيط رشدي مشتمل بر نمک‌هاي پايه QL (Quoirin & Lepoivre, 1977) و QL تغيير يافته، براي ريزازديادي گلابي توصيه شده است (Abdollahi et al., 2006a; Abdollahi et al., 2006b).

مطابق با يافته‌هاي پژوهشي، تركيب هورموني مورد استفاده در مرحله استقرار[3] كشت درون شيشه‌اي گلابي، مشتمل بر ۱ ميلي‌گرم در ليتر BA و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر تركيب اكسيني IBA يا NAA مي‌باشد (Banno et al., 1988; Banno et al.,1989; Bhojwani et al., 1984; Shibli et al., 1997; Yeo & Reed, 1995).

ميزان پرآوري، طول و تعداد شاخه در ريز ازدیادي گلابي به غلظت BA در محيط كشت، نوع محيط كشت، هورمون‌هاي افزودني ديگر و رقم مورد استفاده بستگي دارد (Bhojwani et al., 1984; Amiri, 2002; Lane, 1979; Singha, 1980; Stimart & Harbage, 1989). در اكثر آزمايشات انجام شده افزايش غلظت BA يا BAP با طول شاخه رابطه عكس و با تعداد شاخه نسبت مستقيم داشت (Freire et al., 2002; Singha, 1980; Roozban et al., 2003). بهترين شاخه‌رويي در گلابي وحشي *(Pyrus syriaca)* روي محيط MS با ۱/۵ تا ۲ ميلي‌گرم در ليتر BA بدست آمد (Shibli et al., 1997). همچنين در شاخه‌رويي رقم بوره بوسك، محيط MS همراه با ۵ ميكرومولار BA و ۰/۶ ميكرومولار GA3 و ۰/۵ ميكرومولار IBA را پيشنهاد گرديد (Bell et al., 1999). BA به همراه شدت نور بالا مي‌تواند باعث بهبود شاخه‌رويي شود (Dolcet-Sanjuan et al., 1990). همچنين توسعه برگ‌ها و وزن تر و خشک ريز نمونه‌ها مي‌تواند تحت تاثير محيط كشت قرار گيرد (Hartmann et al., 1997). نوع محيط كشت (جامد، مايع يا غوطه‌ورسازي) ممكن است مشكلاتي مثل شيشه‌اي‌شدن ريز نمونه‌ها را در پي داشته باشد (Daminco et al., 2002). نوع سيتوكينين مثل BAP و 2ip با غلظت‌هاي مختلف به همراه اكسين‌هايي مانند IBA موجب پرآوري شاخه‌هاي مطلوب و افزايش بقاي ريزشاخه‌ها و توسعه برگي آنها در ارقام مختلف مي‌شود (Abdollahi et al., 2006a; Abdollahi et al., 2006b; Sedlak & Paprstein, 2003).

عوامل محيطي مثل دما، نور و طول مدت روشنايي در كنار تركيب هورموني محيط كشت، مي‌تواند باعث پرآوري بيشتر و بهبود ديگر صفات رشدي ريز نمونه‌ها شود. در يک تحقيق بيشترين ميزان پرآوري شاخه در دماي ۲۷ درجه سانتي گراد بدست آمد (Pasqual et al., 2002). افزايش شدت نور از ۱۰ تا۸۰ ميكرومول بر متر مربع در ثانيه و طول مدت روشنايي از ۱۶ به ۲۴ ساعت منجر به افزايش در تعداد شاخه، طول شاخه، وزن تر و خشك شاخه‌هاي رشد كرده مي شود (Wang, 1992). در اغلب گزارش‌ها طول دوره روشنايي و تاريكي در مرحله استقرار، ۱۶ ساعت روشنايي و ۸ ساعت تاريكي عنوان شده است (Shibli et al., 1997; Wang, 1992; Yeo & Reed, 1995).

هدف از اجراي اين تحقيق، بررسي امكان ازدياد درون شيشه‌اي (ريزازديادي) چهار رقم گلابي در محيط‌هاي مختلف كشت با تركيب هورموني متفاوت و بهينه‌سازي آن جهت رفع مشكلات روش‌هاي تكثير سنتي مي‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گياهي مورد استفاده، ريزنمونه‌هاي تهيه شده از كشت‌هاي درون شيشه‌اي بودند كه از قبل تهيه شده بود. در ۳ آزمايش انجام شده، هر يك از محيط‌هاي كشت داراي ۳۰ گرم ساكارز، ۷/۵ گرم آگار بود و pH محيط حدود ۵/۷ قبل از اتوكلاو كردن تنظيم گرديد. زمان استريل،۲۰ دقيقه در فشار ۱/۲ اتمسفر و دماي ۱۲۱ درجه سانتي‌گراد بود. داخل هر شيشه با حدود ۳۰ ميلي ليتر محيط كشت، چهار ريزنمونه به طور عمودي كشت شد. ميانگين دماي روز و شب اتاقك رشد به ترتيب۲ ±۲۷ و ۲±۲۲ درجه سانتي‌گراد بود. روشنايي با استفاده از لامپ‌هاي فلوئورسنت با نور سفيد با شدت نور بين ۲۰ تا ۴۰ ميكرو مول بر متر مربع در ثانيه و فتوپريود ۱۶ ساعت

1. Driver and Kuniyki Walnut 1984
2. Woody Plant Medium
3 . Establishment

روشنايي و ۸ ساعت تاريكي بود.

آزمايش اول: ارزيابي اثر محيط كشت‌هاي اوليه روي چهار رقم گلابي

در آزمايش اول چهار نوع محيط كشت بكار برده شد: ۱)محيط MS ۲) محيط MS با نصف عناصر پرمصرف و غلظت كامل عناصر كم مصرف؛ ۳) MS با نصف غلظت تركيبات نيتروژني و كل غلظت بقيه عناصر پرمصرف و كم مصرف؛ ٤) عناصر پرمصرف محيط QL به اضافه عناصر كم مصرف و مواد آلي محيط MS، كه به ترتيب MS، MS/2، MSN/2 و MQL ناميده شدند. علاوه بر اين هر يك از محيط‌هاي كشت داراي ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر IBA و يك ميلي‌گرم در ليتر BA بود.

در اين آزمايش، يادداشت برداري، چهار هفته بعد از واكشت ريزنمونه‌ها انجام شد. صفات مورد اندازه‌گيري شامل طول شاخه، تعداد شاخه و رنگ ظاهري كشت‌ها بود. طرح آزمايشي مورد استفاده نيز فاكتوريل در قالب طرح كاملا تصادفي با دو فاكتور رقم و محيط بود.

آزمايش دوم: ارزيابي اثر محيط كشت‌هاي ثانوي روي چهار رقم گلابي

بر اساس نتايج بدست آمده از آزمايش اول و به منظور ارزيابي دقيق‌تر محيط‌هاي كشت، آزمايش دوم طرح ريزي شد. بنابراين با تغييراتي در محيط‌هاي قبلي، ۱۰ نوع محيط كشت (جدول ۱) با همان تركيب هورموني آزمايش قبل، مورد استفاده قرار گرفت. تغييرات محيط‌هاي كشت شامل دو برابر نمودن ميزان عناصر كم مصرف (B)، دو برابر نمودن ميزان نيتروژن و نصف نمودن ميزان نيتروژن بود. ريزنمونه‌ها جهت حذف آثار بجامانده از محيط‌هاي قبلي، به مدت يک ماه در محيط‌هاي جديد قرار گرفتند و پس از آن واكشت شدند. يادداشت برداري و ارزيابي آنها، شش هفته بعد و با يك واكشت در هفته سوم انجام گرفت. صفات مورد ارزيابي شامل تعداد شاخه، طول شاخه، رنگ برگ و اندازه برگ بود. طرح آزمايشي مورد استفاده در اين مرحله نيز فاكتوريل در قالب طرح كاملاً تصادفي با دو فاكتور رقم و محيط كشت بود. آزمايش‌هاي اول و دوم مربوط به مرحله بهينه‌سازي استقرار چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي بود، كه با نتايج بدست آمده از اين دو آزمايش، اين مرحله به اتمام رسيد و مرحله دوم يعني شاخه رويي آغاز گرديد.

جدول ۱- ده نوع محيط كشت مورد استفاده در آزمايش اول و دوم

رديف	نوع محيط كشت	رديف	نوع محيط كشت
۱	MQL2B	٦	MS 2N
۲	MS N/2 2B	۷	MQL
۳	MS/2 2B	۸	MS N/2
۴	MS2N2B	۹	MS
۵	MS2B	۱۰	MS/2

B به عنوان حرف مشخص كننده عناصر ميكرو محيط كشت MS در نظر گرفته شده است. MQL محيط تغيير يافته QL مي باشد.

آزمايش سوم: شاخه‌رويي (پرآوري شاخه)[1]

با استفاده از نتايج بدست آمده از مرحله استقرار، محيط MS/2 براي مرحله شاخه‌رويي انتخاب گرديد. به منظور يكسان سازي شرايط، همه كشت‌ها به مدت يك ماه به محيط جديد، با همـان نسبت هورموني ۱ ميلي‌گرم در ليتر BA و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر IBA كشت شدند. در مرحله شاخه‌رويي با استفاده از محيط كشت پايه MS/2 تيمارهاي هورموني مورد بررسي قرار گرفتند. از تركيبات سايتوكينيني، يك نوع (BA) در سه سطح ۱، ۲ و ۳ ميلي‌گرم در ليتر و از تركيبات اكسيني NAA, IBA به ميزان ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر استفاده شد. كشت‌ها به مدت شش هفته و با انجام يک واكشت در هفته سوم، در اين محيط‌ها قرار گرفتند و سپس يادداشت برداري انجام شد و آزمايش مذكور داراي سه فاكتور رقم، غلظت BA و نوع اكسين بود، كه بصورت فاكتوريل در قالب طرح كاملاً تصادفي انجام شد. در ۳ آزمايش انجام شده، هر شيشه به عنوان يك واحد آزمايشي منظور شد و هر آزمايش حداقل داراي سه تكرار بود. در تمام آزمايش‌ها، تعداد شاخه‌ها بر اساس تعداد شاخه‌هاي با طول بيش از ۱/۲ سانتي‌متر، طول شاخه بر حسب سانتي‌متر تا يك رقم اعشار و رنگ برگ و اندازه برگ بر حسب نمره‌دهي از يك تا ده اندازه‌گيري شد. ميانگين داده‌هاي مربوط به ريزنمونه‌هاي درون هر شيشه در محاسبات مورد استفاده قرار گرفت. محاسبات آماري با كمك نرم‌افزار كامپيوتري MSTATC انجام شد و نمودارهای آن با نرم‌افزار EXCEL رسم گرديد. مقايسه ميانگين‌ها نيز با استفاده از آزمون دانكن در ۲ سطح ۱% و ۵% انجام شد.

1. Proliferation

نتايج و بحث

نتايج ارزيابي چهار نوع محيط كشت (آزمايش اول)

بر اساس جدول تجزيه واريانس (جدول۲)، اثر رقم، اثر محيط كشت و اثر متقابل آنها در صفات اندازه‌گيري شده شامل تعداد شاخه‌ها، طول شاخه و رنگ برگ معني‌دار بود. رقم نطنزي بالاترين ميزان پرآوري شاخه‌هاي با طول بيش از ۱/۲ سانتي‌متر را توليد كرد. محيط كشت MS/2 موجب بالاترين ميزان شاخه رويي شد و محيط كشت MQL براي هيچ يك از ارقام مناسب نبود (جدول ۳) كه با نتايج Banno et al. (1988, 1989) و Shibli et al. (1997) مطابقت دارد. شايد بتوان دليل برتري محيط MS/2 را در كمتر بودن ميزان نمك‌ها و به خصوص ازت ارتباط داد آنچنانكه محققين ديگر نيز استفاده از محيط‌هاي با غلظت كمتر به ويژه نيتروژن را توصيه نمودند. مقايسه اثر متقابل رقم در محيط كشت نشان داد كه بالاترين طول شاخه مربوط به رقم ويليامز در محيط MQL بود. محيط كشت MQL در مجموع كمترين ميزان شاخه‌رويي را داشت. در بين ارقام آزمايش شده، رقم ويليامز، شاخه‌رويي پائيني داشته است بنابراين اثر متقابل آنها باعث بالاترين طول شاخه گرديد كه رابطه عكس تعداد شاخه با طول شاخه را نشان مي‌دهد. زيرا افزايش تعداد شاخه‌هاي جانبي موجب كاهش سهم مواد غذايي هر شاخساره و رشد كمتر آن مي‌گردد. اين نتايج منطبق با نتايج تحقيقات Singha (1980)، Lane (1979)، Bhojwani et al. (1984) و Stimart & Harbage (1989) مي‌باشد.

جدول ۲- تجزيه واريانس اثر چهار نوع محيط كشت بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

منابع تغيير	درجه آزادي	ميانگين‌مربعات		
		تعداد شاخه	طول شاخه	رنگ برگ
رقم	۳	۰/۰۸۹ **	۱/۱۵٦ **	۷/۹۷۰ **
محيط كشت	۳	۰/۳۹۹**	۰/۰۸۷٤**	۱۸/٤۱۵ **
اثر متقابل رقم × محيط كشت	۹	۰/۰۳۲**	۱/۱۲۲**	۷/۱٤۱ **
خطا	۳۲	۰/۰۰٤	۰/۰۸٤	۰/٦۸٤

* اختلاف معني‌دار در سطح ۵%، ** اختلاف معني‌دار در سطح ۱%

رنگ برگ مستقل از ساير صفات بوده و تنها بستگي به سلامت ظاهري ريزنمونه، ژنوتيپ و نوع محيط كشت داشت. رقم نطنزي بهترين سازگاري با شرايط درون شيشه‌اي و بهترين رنگ برگ را نشان داد كه احتمالاً مربوط به ژنوتيپ اين رقم مي باشد. محيط كشت MS، از نظر رنگ برگ بهترين بود (جدول۲). بعلاوه اثر متقابل اين دو فاكتور اين صفت را تقويت كرد (جدول ٤). محيط كشت MQL براي هيچ يك از ارقام مناسب نبود كه احتمالاً ناشي از به هم خوردن توازن عناصر مختلف در اين محيط مي‌باشد. در محيط كشت MS/N2 به دليل كمبود نيتروژن، برگ‌ها كوچک و تكامل نيافته و سبز متمايل به زرد بودند و علايم كمبود نيتروژن را نشان مي‌دادند اما در محيط MS/2 به دليل توازن بهتر عناصر، رنگ برگ‌ها سبزتر و طبيعي‌تر بود.

نتايج ارزيابي اثر ۱۰ نوع محيط كشت روي چهاررقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي (آزمايش دوم)

در اين آزمايش، علاوه بر صفات قبلي، اندازه برگ نيز يادداشت‌برداري شد. طبق جدول تجزيه واريانس (جدول۵) اثر هر دو فاكتور رقم و محيط كشت، بر صفات اندازه‌گيري شده معني‌دار بود و آثار متقابل آنها نيز در همه صفات اندازه‌گيري شده به غير از ارتفاع شاخه معني‌دار بود. رقم نطنزي بالاترين ميزان پرآوري شاخه و رقم ويليامز كمترين ميزان شاخه‌رويي را داشت. بين محيط كشت MSN/2 و MS/2 از نظر ميزان پرآوري شاخه اختلاف معني‌داري وجود نداشت اما رشد و توسعه برگ‌ها در محيط MS/2 به دليل توازن بهتر عناصر، بسيار بهتر بود و شاخه‌ها شكل طبيعي و برگ‌هاي كامل داشتند در صورتيكه در محيط MSN/2 به دليل عدم توازن عناصر و مخصوصاً كمبود نيتروژن، شاخه‌ها فرم طبيعي نداشت و برگ‌ها بسيار كوچک بودند (جدول٦). رقم نطنزي بالاترين و رقم ويليامز كمترين نمره رنگ برگ را داشتند و محيط كشت MS بهترين رنگ برگ را به خود اختصاص داده است كه احتمالاً به دليل بالا بودن ميزان نيتروژن و توازن مناسب عناصر آن بوده است. در محيط MS به دليل سرشاري مواد غذايي، برگ‌ها خيلي زود توسعه پيدا كردند اما در محيط MS/2 تكامل برگ‌ها از نظر زمان لازم، متوسط بود.

بررسي نتايج آزمايش پرآوري شاخه (آزمايش سوم)

بر اساس نتايج تجزيه واريانس (جدول۷)، اثر فاكتور رقم بر همه صفات اندازه‌گيري شده معني‌دار بود. فاكتور غلظت BA بر طول شاخه، تعداد شاخه و اندازه برگ اثر

معني‌دار داشت. ولي اثر غلظت BA بر رنگ برگ معني‌دار نبود كه انتظار نيز جز اين نبود. اثر متقابل رقم در غلظت BA بر صفات تعداد شاخه و بزرگي برگ معني‌دار بود و بر بقيه صفات اندازه‌گيري شده معني‌دار نبود. فاكتور نوع اكسين فقط بر طول شاخه اثر معني‌دار داشت. دليل استفاده از تركيبات اكسيني در آزمايش‌هاي پرآوري شاخه نيز نقشي است كه اين تركيبات در رشد طول شاخه دارند.

جدول ۳- مقايسه ميانگين‌هاي اثر چهارنوع محيط كشت بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

	ميانگين‌ها		
	تعداد شاخه	طول شاخه	رنگ برگ
رقم			
ويليامز	۰/۸۰ b	۱/۹۱ a	۲/۵۰ b
درگزي	۰/٦٥ b	۱/۲۸ b	۲/٦۳ b
شاه‌ميوه	۰/۹۱ b	۱/۲۳ b	۳/۳۳ b
نطنزي	۱/۸۰ a	۱/٥٤ b	٤/۲۸ a
محيط كشت			
MS	۰/۷۰ b	۱/۸۸ a	٤/٤ a
MS/2	۱/۷۹ a	۱/۲٦ b	۳/٤۸ ab
MS N/2	۱/٥۹ a	۱/٤۳ b	۳/٤۲ b
MQL	۰/۰۸ c	۱/٤ b	۱/٤٥ c

حروف مشابه در هر ستون نشانگر غيرمعني دار بودن اختلاف ميانگين ها با استفاده از روش دانكن مي باشد.

جدول ٤- مقايسه ميانگين‌هاي اثر متقابل رقم در محيط كشت، بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

	ميانگين‌ها		
رقم × محيط كشت	تعداد شاخه	طول شاخه	رنگ برگ
ويليامز× MS	۰/٤۳ fg	۱/۷۷ bcd	۳/۱۷ cde
ويليامز×MS/2	۱/۸۲ bc	۱/٤۷ cde	۳/۱۳ cde
ويليامز× MS N/2	۰/۸٦ def	۱/٦۹ bcd	۲/٤۸ def
ويليامز× MQL	۱ g	۲/۷۲ a	۱/۲٤ efg
درگزي×MS	۰/۳۷ fg	۱/۳۱ def	۲/۷ cde
درگزي×MS/2	۱/۲ cde	۱/۱ def	۱/٤۲ efg
درگزي× MS N/2	۰/۸۳ ef	۱/۱۸ def	۲/۷۸ cde
درگزي× MQL	۰/۲ g	۱/٥٤ cd	۳/٥۹ bcd
شاه‌ميوه× MS	۰/٤ fg	۲/۳۱ ab	٥/۳ ab
شاه‌ميوه×MS/2	۱/۳۰ cde	۱/۲ def	٤/٥۷ abcd
شاه‌ميوه×MS N/2	۲/۲ ab	۰/۷٥ ef	۲/۸ cde
شاه‌ميوه× MQL	. g	۰/٦۷ f	۰/٦۷ fg
نطنزي×MS	۱/٦۲ bce	۲/۲۳ abc	٦/٤۱ a
نطنزي×MS/2	۳/۱ a	۱/۲٥ def	٤/۷۷ abc
نطنزي× MS N/2	۲/٤۷ ab	۲/۰۹ abc	٥/٦۳ a
نطنزي× MQL	. g	۰/٦۷ f	۰/۳۲ g

حروف مشابه در هر ستون نشانگر غيرمعني دار بودن اختلاف ميانگين ها با استفاده از روش دانكن مي باشد.

جدول ٥- تجزيه واريانس اثر ۱۰ نوع محيط كشت، بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

منابع تغيير	درجه آزادي	ميانگين مربعات				
		طول شاخه	تعداد شاخه	اندازه كالوس	رنگ برگ	اندازه برگ
فاكتور رقم	۳	۰/٦٥٥**	۰/۰٦۰**	۰/۱۷۳**	۰/٤۲۳**	۲۹/۷۰٦**
فاكتور، محيط كشت	۹	۰/۲۸*	۰/۰۲٤**	۰/۲٥۷**	۰/٤۰۰**	٦۷/۸۱۲**
اثر متقابل‌رقم× محيط كشت	۲۷	۰/۰۲۰n.s	۰/۰۰۷*	۰/۰۳۰*	۰/۰٦۲**	۱۰/۷۹۹**
خطا	۱۲۰	۰/۰۱٥	۰/۰۰٤	۰/۰۱۹	۰/۰۲۱	۲/٦٤۰

* اختلاف معني‌دار در سطح ۵%، ** اختلاف معني‌دار در سطح ۱%
ns: بدون اختلاف معني‌دار

جدول ٦- مقايسة ميانگين‌هاي اثرات ۱۰ نوع محيط كشت بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

	طول شاخه	تعداد شاخه	رنگ برگ	اندازه برگ
رقم				
ويليامز	۱/٦۲ b	۱/۳۱ b	٥/۳c	٤/۷۳c
درگزي	۰/۹٥c	۲/٦۳ a	٦/۹٦ b	٥/۹٥ ab
شاه‌ميوه	۱/۳۷ bc	۱/۷۹ b	٥/۸٦ c	٥/۷۸ b
نطنزي	۲/۸٦a	۲/٦۹ a	۸/٥٦a	٦/۸۳ a
محيط كشت				
MQL 2B	۱/٤۲ b	۱/۷۳ bcd	۲/۸۹ c	۲/۸۸ e
MS N/2 2B	۱/۷۷ ab	۲/٦۱abc	۸/٤۱ a	٥/٥٦ cd
MS/2 2B	۱/٦۷ ab	۲/٥۷ bc	۷/٥۸ a	٦/٦۳ bc
MS 2N 2B	۱/٤٦ b	۱/٥ cd	٦/۸۱ a	٦/۸۸ bc
MS 2B	۱/٥۷ ab	۱/٥ cd	٦/۷٥ a	٦/۸۱ bc
MS 2N	۱/٤۷ b	۱/۲٥ d	٤/۹۷ bc	٤/۱۹ de
MQL	۱/۳۷ b	۱/٦٦ bcd	۳/٦۱ bc	۲/۸۸ e
MS N/2	۲/۳۹ a	۳/۲۲ a	۸/٥۹ a	٥/٥٦ cd
MS	۲/۰۰ ab	۱/۹٤ abcd	۸/۳۸ a	۷/٤٤ b
MS/2	۱/۸۸a b	۳/۰٦ a	۸/۷۳ a	۹/۳۸ a

حروف مشابه در هر ستون نشانگر غيرمعني دار بودن اختلاف ميانگين ها با استفاده از روش دانكن مي باشد.

در بين ارقام مورد آزمايش، رقم نطنزي بالاترين ميزان پرآوري شاخه را داشته است (جدول ۸) كه تا حدودي وابسته به ژنوتيپ گياه مي‌باشد. با افزايش غلظت BA، تعداد شاخه نيز افزايش پيدا كرد كه با نتايج Stimart & Harbage (1989) و Brardi et al. (1993) مطابقت داشت و دليل آن نيز نقش فيزيولوژيكي تركيبات سايتوكينيني در كاهش غالبيت انتهايي و بهبود رشد شاخه‌هاي جانبي مي‌باشد. اثرات متقابل رقم در غلظت سايتوكنين نشان داد كه حداكثر پرآوري شاخه مربوط به رقم درگزي در غلظت

۲ ميلي‌گرم در ليتر BA بود و غلظت ۳ ميلي‌گرم در ليتر، در اين رقم ضمن افزايش ميزان پرآوري، به دليل كاهش سهم مواد غذايي هر يک از شاخه‌ها، باعث كاهش تعداد شاخه‌هاي با طول بيش از ۱/۲ سانتيمتر شد. رقم شاه‌ميوه نيز در غلظت ۲ ميلي‌گرم در ليتر BA پرآوري بيشتري را داشت. در مورد ارقام ويليامز و نطنزي غلظت سه ميلي‌گرم در ليتر BA پرآوري بهتري را ايجاد كرد (جدول۹). Shibli et al. (1997) نيز بالاترين ميزان توليد شاخه را با ۲-۱/۵ ميلي گرم در ليتر BA به دست آوردند. در بين ارقام مورد آزمايش، رقم درگزي حداقل رشد طولي را داشته و بقيه ارقام مشابه بودند. اثر IBA بر رشد طولي بهتر از NAA بود كه احتمالاً به دليل پاسخ بهتر ارقام مورد آزمايش به اين نوع اكسين مي‌باشد (جدول ۸) كه با نتايج آزمايش‌هاي Brardi et al. (1993)، Yeo & Reed (1995) و Bell & Reed (2002) همخواني داشت. با افزايش غلظت BA ميزان رشد طولي شاخه‌ها به دليل افزايش پرآوري شاخه و كاهش سهم مواد غذايي هر شاخه، كاهش پيدا كرد. طول شاخه با تعداد شاخه و با غلظت BA رابطه عكس داشت.

بالاترين طول شاخه مربوط به غلظت ۱ ميلي‌گرم در ليتر BA و كمترين آن مربوط به غلظت ۳ ميلي‌گرم در ليتر BA بود كه با نتايج Singha (1980)، Stimart & Harbage (1989)، Lane (1979) و Shibli et al. (1997) مطابقت دارد. در بين ساير عوامل، فاكتور رقم بر روي رنگ برگ تأثيرگذارتر بود كه نشان داد رنگ برگ بيشتر از هر چيز وابسته به ژنوتيپ است. ارقام درگزي و شاه‌ميوه داراي برگ‌هاي پر رنگ‌تري بودند كه با خصوصيات كشت فضاي آزاد اين ارقام نيز منطبق بود (جدول۸). در غلظت‌هاي بالاي BA و به دليل توليد شاخه‌هاي بيشتر، برگ‌ها فرصت رشد و تكامل پيدا نكردند زيرا مواد غذايي جذب شده صرف توليد شاخه‌ها شده و تكاپوي توسعه برگ‌ها را نداشت. اما در غلظت ۱ ميلي‌گرم در ليتر ميزان پرآوري شاخه كم ولي برگ‌ها رشد بسيار خوبي داشتند. بزرگي برگ‌ها همچنين تحت تأثير رقم بود و رقم درگزي بزرگترين برگ‌ها را داشت (جدول۸). اثر متقابل رقم در غلظت BA نيز بر رشد برگ‌ها معني‌دار بوده و رقم نطنزي در ۱ ميلي‌گرم در ليتر BA برگ‌هاي تكامل يافته توليد كرد در حاليكه همين رقم در غلظت ۳ ميلي‌گرم در ليتر BA به دليل شاخه‌رويي بالا، كوچك‌ترين برگ‌ها را داشت (جدول۹). اثر متقابل سه فاكتور رقم، نوع اكسين و غلظت BA، نشان داد كه بالاترين طول شاخه مربوط به رقم نطنزي با يك ميلي‌گرم در ليتر BA و ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر NAA بود كه به دليل تعداد شاخه كمتر و افزايش سهم هر شاخه از مواد غذايي بوده است (جدول۱۰).

جدول ۷- تجزيه واريانس اثر نوع اكسين (IBA و NAA هر كدام به ميزان ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر) و غلظت بنزيل آدنين (۱، ۲ و ۳ ميلي‌گرم در ليتر) بر پرآوري شاخه چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

منابع تغيير	درجه آزادي	ميانگين مربعات			
		طول شاخه	تعداد شاخه	رنگ برگ	اندازه برگ
فاكتور A: رقم	۳	۱/۹۴۳**	۹/۴۸۸**	۰/۶۴۸**	۶/۲۹۵**
فاكتور B: نوع اكسين	۱	۳/۰۹۶**	۱/۱۰۰$^{n.s}$	۰/۲۹۴$^{n.s}$	۱/۱۲۵$^{n.s}$
اثرات متقابل رقم × نوع اكسين	۳	۰/۰۴۵$^{n.s}$	۰/۲۰۸$^{n.s}$	۰/۰۲۶$^{n.s}$	۰/۵۵۶$^{n.s}$
فاكتورC: غلظت بنزيل آدنين	۲	۲۰/۰۳۷**	۱۰۲/۰۹۴**	۰/۲۲۴$^{n.s}$	۱۲/۲۳۲**
اثر متقابل رقم × غلظت بنزيل آدنين	۶	۰/۰۲۱$^{n.s}$	۴/۴۱۸*	۰/۱۰۷$^{n.s}$	۲/۳۶۲**
اثر متقابل نوع اكسين × غلظت بنزيل آدنين	۲	۰/۳۱۹$^{n.s}$	۰/۳۲۲$^{n.s}$	۰/۰۵۱$^{n.s}$	۰/۱۲۸$^{n.s}$
اثر متقابل رقم × نوع اكسين × غلظت بنزيل آدنين	۶	۰/۴۹۲**	۱/۷۸۹$^{n.s}$	۰/۳۹۶**	۰/۲۶۶$^{n.s}$
خطا	۴۸	۰/۱۴۰	۱/۵۵۷	۰/۰۹۸	۰/۳۱

* اختلاف معني‌دار در سطح 5%، ** اختلاف معني‌دار در سطح ۱%، ns بدون اختلاف معني‌دار

جدول ۸- مقايسه ميانگين‌هاي اثر نوع اكسين (IBA و NAA هر كدام به ميزان ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر) و غلظت‌هاي مختلف BA (۱، ۲ و ۳ ميلي‌گرم در ليتر) بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

	ميانگين‌ها			
	طول شاخه	تعداد شاخه	رنگ برگ	اندازه برگ
رقم	**	**	**	**
ويليامز	۲/۸٤^{a}	٤/۰۱^{b}	۸/٦٤^{b}	٦/۷۸^{ab}
درگزي	۲/۱۷^{b}	٤/۵۸^{ab}	۸/۹۸^{a}	۷/۱۷^{a}
شاه‌ميوه	۲/۸۸^{a}	٤/۱٤^{b}	۸/۹۵^{a}	٦/٦۳^{b}
نطنزي	۲/۷۲^{a}	۵/٦۱^{a}	۸/٦٤^{b}	۵/۷۷^{c}
نوع اكسين	**	n.s	n.s	n.s
IBA	۲/۸٦^{a}	٤/۷۱	۸/۷٤ $^{-}$	٦/٤٦
NAA	۲/٤۵^{b}	٤/٤٦	۸/۸۷$^{-}$	٦/۷۱
غلظت بنزيل آدنين	**	**	n.s	**
يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/٦^{a}	۲/۵۳^{c}	۸/۷	۷/۳۷^{a}
دو ميلي‌گرم در ليتر	۲/۵۹^{b}	٤/۵۸^{b}	۸/۸۲	٦/٤۱^{b}
سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۷۸^{c}	٦/٦۵^{a}	۸/۸۹	۵/۹۸^{c}

** حروف مشابه در هر ستون نشانگر غيرمعني‌دار بودن اختلاف ميانگين‌ها با استفاده از روش دانكن (در سطح ۱%) مي‌باشد.

جدول ۹- مقايسه ميانگين‌هاي اثر متقابل رقم در غلظت BA (۱، ۲ و ۳ ميلي‌گرم در ليتر) بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

رقم × غلظت BA	ميانگين‌ها			
	طول شاخه $^{n.s}$	تعداد شاخه *	رنگ برگ $^{n.s}$	اندازه برگ **
ويليامز × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۷۳۰	۱/۳۸^{f}	۸/۳۷	۷/۷۲^{b}
درگزي × يك ميلي‌گرم در ليتر	۲/٦۸	٤/۱۸^{cd}	۸/۷۷	٦/۷۵^{cd}
شاه‌ميوه × يك ميلي‌گرم در ليتر	۲/۱۲	٤/۱۸^{de}	۸/۷۸	۵/۸۸^{de}
نطنزي × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۲	۱/۸۸^{ef}	۸/۹۵	۸/۷^{a}
ويليامز × دو ميلي‌گرم در ليتر	۲/۰۲	٤/٤۲^{cd}	۹	٦/٦۳^{cd}
درگزي × دو ميلي‌گرم در ليتر	۱/۳	۷/٤۳^{a}	۹	٦/۱۷^{de}
شاه‌ميوه × دو ميلي‌گرم در ليتر	۳/٦۲	٦/٤۷^{ab}	۹	۷/٤۵^{bc}
نطنزي × دو ميلي‌گرم در ليتر	۳/۰۷	۳/۵۷^{d}	۸/۹	٦/۲۳^{de}
ويليامز × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۹٦	۵/۵۳^{bcd}	۸/۹۵	٦/۲^{de}
درگزي × سه ميلي‌گرم در ليتر	۳/۸۵	۳/۵۲^{d}	۸/٤۸	۵/٦۲^{e}
شاه‌ميوه × سه ميلي‌گرم در ليتر	۲/۵۸	٦/۱۵^{ab}	۸/٦	٦/۰۳^{de}
نطنزي × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۷۳	۷/۱٦۷^{ab}	۸/۸۳	۵/٦۵^{e}

* و ** حروف مشابه در هر ستون نشانگر غيرمعني‌دار بودن اختلاف ميانگين‌ها با استفاده از روش دانكن (در سطح ۵% و ۱%) مي‌باشد.

نتيجه‌گيري كلي

سه آزمايش انجام شده نشان داد محيط كشت MS/2 حداكثر پرآوري شاخه و محيط كشت MS در اكثر موارد بيشترين ميزان رشد و بزرگترين سطح برگ را داشت. بنابراين در مرحله استقرار ريز ازديادي ارقام مورد آزمايش، يك برنامه كلي دو مرحله‌اي، شامل استفاده از محيط MS/2 جهت دستيابي به تعداد شاخه اوليه مورد نياز و رشد و توسعه شاخه‌ها با استفاده از محيط MS قابل توصيه است. براي ارقام درگزي و شاه‌ميوه، غلظت ۲ ميلي‌گرم در ليتر و براي ارقام نطنزي و ويليامز، غلظت ۳ميلي‌گرم در ليتر BA حداكثر پرآوري شاخه را باعث شد. IBA با غلظت ۰/۱ ميلي‌گرم در ليتر اثر بيشتري نسبت به NAA با همين غلظت بر رشد طولي شاخه‌هاي پرآوري شده دارد.

جدول ۱۰- مقايسه ميانگين‌هاي اثرات متقابل نوع اكسين (IBA و NAA) در غلظت‌هاي مختلف BA بر چهار رقم گلابي در شرايط درون شيشه‌اي

رقم × نوع اكسين × غلظت BA	ميانگين‌ها			
	طول شاخه**	تعداد شاخه n.s	رنگ برگ**	بزرگي برگ n.s
ويليامز × IBA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/٦ abcd	۱/۵۳	۸/۰۷ b	۸
ويليامز × IBA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۲/۹۳ b…f	٤/۰۷	۹ a	٦/۷۷
ويليامز × IBA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۲/٤ e…h	٦/٤۳	۸/۵۷ ab	۵/۷۷
ويليامز × NAA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۸۷ ab	۱/۲۳	۸/٦۷ ab	۷/٤۳
ويليامز × NAA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۲/٤ e…h	٤/۳	۸/۵۳ ab	٦/۷۳
ويليامز × NAA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۸۳ g…I	٦/۵	۹ a	٦
درگزي × IBA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۷ abc	۲/۳	۸/۹ a	۸/٦۷
درگزي × IBA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۲/۱۳ f…I	۵/۰۳	۹ a	٦/٦
درگزي × IBA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۳۷ I	۷/۱۷	۹ a	٦
درگزي × NAA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۲/۷ d…g	۱/٤۷	۹ a	۸/۷۳
درگزي × NAA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۱/۹ ghi	۳/۸	۹ a	٦/٦۷
درگزي × NAA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۲۳ I	۷/۷	۹ a	٦/۳۳
شاه‌ميوه × IBA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۷ abc	۲/٦۷	۹ a	٦/۷۷
شاه‌ميوه × IBA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۳/۳a…e	۳/٦۳	۸/۸ ab	٦/۰۳
شاه‌ميوه × IBA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۲/۳۱ fgh	٦/۵۷	۸/۹ a	٦
شاه‌ميوه × NAA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۵۳ a…d	۳/۹۷	۹ a	۸/۱۳
شاه‌ميوه × NAA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۲/۸۳ e…f	۳/۵	۹ a	٦/٤۳
شاه‌ميوه × NAA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/٦ h…I	٤/۵	۹ a	٦/٤
نطنزي × IBA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۸ ab	۳/۵۷	۸/۷۷ ab	۵/۵۷
نطنزي × IBA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۳/۳ a…c	٦/۲۷	۸/۲ ab	٦/۰۳
نطنزي × IBA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/۸ ghi	۷/۲۷	۸/٦۷ ab	۵/۳۳
نطنزي × NAA × يك ميلي‌گرم در ليتر	۳/۹ a	۳/٤۷	۸/۲ ab	۵/٦۷
نطنزي × NAA × دو ميلي‌گرم در ليتر	۱/۸۷ ghi	٦/۰۳	۹ a	٦/۰۳
نطنزي × NAA × سه ميلي‌گرم در ليتر	۱/٦۷ hi	۷/۰۷	۹ a	۵/۹۷

** حروف مشابه در هر ستون نشانگر غيرمعني‌دار بودن اختلاف ميانگين‌ها با استفاده از روش دانكن (در سطح ۱%) مي‌باشد.

REFERENCES

1. Abdollahi, H., Rosario M. & Eddo, R. (2006a). Study on basal medium, plan growth regulators and pektine on micropropagation of pear (*pyrus communis* L.). *Journal of Seed & plant*, 21(3), 373-384. (In Farsi).
2. Abdollahi, H., Rosario M. & Eddo, R. (2006b). Optimisation of regeneration and maintenance of morphogenic callus in pear (*Pyrus communis* L.) by simple and double regeneration techniques. *Scientia Horticulturae*, 108, 352-358.
3. Al–Maarri, K., Arnaud, Y. & Misipiac, E. (1994). Micropropagation of *Pyrus communis* Passe Crassanseedling and cultivar Williams: Factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. *Scientia Horticuturae*, 58, 207-214.
4. Amiri, M. E. (2002). Mass propagation of a unique variety of Pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm.) NAK. CV. Sebri) by shoot tip cultue *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 587, 555-561.
5. Banno, K., Hayashi, S., Tanabe, K. & Tokkuzumi, A. (1988). *In vitro* propagation of Japanese pear rootstocks. *Plant Tissue Culture Letters*, 5(2), 87-89.
6. Banno, K., Yoshida, K., Hayashi, S. & Tanabe, K. (1989). *In vitro* propagation of Japanese pear cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 58 (1), 37-42.
7. Bell, R. L. & Reed, B. M. (2002). *In vitro* tissue culture of pear. In: Advances in techniques for micropropagation and germplasm preservation.
8. Bell, R. L., Quamme, H. A., Layne, R. & Skirvin, R. M. (1996). Pears, In: *Fruit Breeding*, vol.1., eds. Janick, J. and Moore, J. W., pp. 444-514. John Wiley Sons. Inc., USA.

9. Bell, R. L., Scorza, R., Srinivasan, Ch. & Weeb, K. (1999). Transformation of Beurre Bosc Pear with the rolC Gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124(6), 570-574.
10. Brardi, G., Infante, R. & Neri, D. (1993). Micropropagation of *Pyrus calleryana* Den. From seedings. *Scientia Horticulturae*, 53, 157-165.
11. Bhojwani, S. S., Mullins, K. & Cohen, D. (1984). *In vitro* propagation of *Pyrus pyrifolia*. *Scientia Horticuturae*, 23, 247-254.
12. Daminco, C., Frattarelli, A. & Giorgioni, M. (2002). Micropropagation of pear through temporary immersion. *Acta Horticulturae*, 596, 425- 429.
13. Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D. W. S. & Mok, M. C. (1990). Micropropagation of pyrus and Cydonia and Responces to Fe-limiting conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 191-199.
14. Freire, I. C. G., Delho, C. P. S. C. & Barros, M. T. F. (2002). Improved culture media for the *in vitro* establishment of pear from nodal cuttings. *Acta Horticulturae*, 569, 457- 461.
15. Hartmann, H. T., Kester, D. E. Davies, F. T. & Geneve, R. L. (1997). *Plant Propagation: Principles and Practices*. (6th ed.) Pearson Prentice- Hall.
16. Hildebrandt, V. & Harney, P. M. (1988). Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of Pelargonium homorum. *Jornal of Horticultural Science*, 63 (4), 651-657.
17. Lane, W. L. (1979). Regeneration of pear plant from shoot meristem-tips. *Plant Sci Lett*, 16, 337-342.
18. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15, 473-497.
19. Pasqual, M., Cavalcante-Alves, J. M., Chalfun, N. N. J., Dutra, L. F. & Bianchi, J. V. (2002). Influence of temperature and sucrose on *in vitro* proliferation of *Pyrus calleriana*. *Acta Horticulturae*, 569, 453- 455.
20. Quoirin, M. & Lepoivre, P. (1977). Improved medium for *in vitro* culture of prunus sp. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
21. Roozban, M. R., Arzani, K., & Moeini, A. (2003). Investigation of In vitro culture of some Asian pear (*Pyrus seratonia* Rehd). *Journal of Seed & plant*, 18(3), 361-348. (In Farsi).
22. Sedlak, J. & Paprstein, F. (2003). Influence of growth regulators on *in vitro* propagation of *Pyrus communis* CV. Koporecka. *Acta Horticulturae*, 616, 379-382.
23. Shibli, R. A., Ajlouni, M. M., Jaradat, A., Aljanabi, S. & Shatnawi, M. (1997). Micropropagation in wild pear (*Pyrus syriaca*). *Scientia Horticulturae*, 68, 237-242.
24. Singha, S. (1980). *In vitro* propagation of Seckel pear. In: Proceedings of. *Conf. On Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture-Application and Feasibiliy*. U.S Dept. Agr. Sci. Educ. Adm. ARR-NE-11, 22 April 1980, Beltsville, MD, pp. 59-63.
25. Stimart, D. P. & Harbage, J. F. (1989). *In vitro* shoot proliferation of *Pyrus calleryana* from vegetative buds. *Horticultural Science*, 24(2), 298-299.
26. Viseur, J. (1987). Micropropagation of pear, *Pyrus communis* L., in a double-phase culture medium. *Acta Horticulturae*, 212, 117-124.
27. Wang, Q. C. (1992). The effect of light, darkness and temperature on micropropagation of the pear rootstocks BP10030. *Journal of Horticultural Science*, 67(6), 869-876.
28. Yeo, D. Y. & Reed, B. M. (1995). Micropropagation of three Pyrus rootstocks. *Horticultural Science*, 30(3), 620-623.
29. Zimmerman, R. H., Bhardwaj, S. V. & Fordham, I. M. (1995). Use of starchgelled medium for tissue culture of some fruit crops. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 43(3), 207-213.