بررسی استقرار و پرآوری پایه های رویشی گیزلا (Gisela,Prunus avium) به روش کشت بافت

روح الله میرشمسی، [۱] کاظم کمالی [۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق ۲- استادیار ، دانشکده منابع طبیعی ، دانشگاه یزد.
نویسنده مسئول:

چکیده

گیزلا (Gisela)یکی از انواع پایه های نیمه کوتاه گیلاس شیرین است که به دلیل داشتن خصوصیاتی نظیر زودبازدهی و محصول دهی پیوندک ،دامنه وسیع سازگاری،رشد متوسط و کنترل شده ، مقاومت به دو ویروس PDV و PNRSV و ازدیاد غیر جنسی به یکی از پایه های رایج تجاری تبدیل شده است . این تحقیق نیز با هدف افزایش راندمان تکثیر این پایه ها از طریق کشت بافت انجام شده است. در این تحقیق از جوانه های جوان گیاهان گلخانه ای ضدعفونی شده با کلرید جیوه ۰/۱ به مدت ۳ دقیقه و آبکشی شده با آب مقطر استفاده شده است. گیاهچه ها در محیط کشت MS(Morashige and Skoog,1962) همراه با ساکاروز ۳درصد و آگار ۷۵ درصد و با استفاده از BAP ۰/۱ میلی گرم در لیتر همراه با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی،۸ساعت تاریکی، درجه حرارت ۲۴ تا ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۴۵ درصد برای رشد طولی انتخاب شد.بعد از ۳ هفته انتقال به محیط شاخه زایی انجام و هر ۲۱ روز واکشت انجام شد.بهترین شاخه زایی در محیط MS و همراه با تیمار هورمونی BAP ۱میلی گرم در لیتر به دست آمد.

کلمات کلیدی :کشت بافت ،BAP ، IBA

مقدمه

تکثیر به وسیله بذر معمولاً به دلیل طبیعت هتروزیگوتی گیاهان که ناشی از دگر گرده افشانی است نامطلوب است (حسن حاج نجاری،۱۳۷۳)و از طرف دیگر به دلیل این که درخت گیلاس یک درخت مهم تجاری به شمار می آید و میوه های آن از نظر تغذیه ای و هم از نظر خواص درمانی مهم به شمار می آیند، تکثیررویشی این گیاه به روش یا روشهای دیگر به ویژه ریزازدیادی مورد توجه قرار گرفته است.

اصطلاح ریز ازدیادی به طور اختصاصی به کاربرد فنون کشت بافت برای گیاه افزایی با استفاده از ریز نمونه هایی که در شرایط عاری از هرگونه آلودگی و درظروف کشت پرورش می یابند مربوط می شود. (Hedrick,U.P.1915)

مواد و روش‌ها

حذف منابع آلودگی در استریل کردن کشت اهمیت زیادی دارد و میکرواگانیسم های موجود در سطح و منافذ پوستی و یا در داخل بافت های ریز نمونه عامل اصلی آلودگی هستند که از مواد ضد عفونی کننده مختلف در غلظت ها و زمان های مختلف جهت حذف این آلودگی ها استفاده می شود نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه و جدا شدن دمبرگهابه طوریکه انتها دمبرگ برای حفاظت از جوانه باقی ماند، توسط اسکالپل به قطعات ۱۰ سانتی متری برش داده شدند و سپس داخل یک بشر آب قرار داده شدند وابتدا ۱۰ دقیقه با آب جاری و سپس با آب مقطر استریل دو بار شستشو داده شده و به داخل بشر استریل ریخته شد.

سپس نمونه ها به زیر هود لامینار منتقل شدند و عمل قطع جوانه های جانبی به وسیله اسکالپل به قطعات۲الی ۳سانتی متری برش داده شد . در روش ضدعفونی از کلرید جیوه ۰/۱ درصد در سه تیمار جداگانه ۳ ، ۴ و ۵ دقیقه استفاده شد و سپس ۳ بار با آب مقطر استریل حاوی اسید آسکوربیک به میزان ۵۰ میلی گرم در cc ۱۰۰ آب شستشو داده شد به طور کلی آلودگی قارچی پس از ۳ روز تا ۱ هفته و آلودگی باکتریایی پس از ۲۰ روز تا ۱ ماه رویت شد.

سپهوند و همکاران ازکلرید جیوه ۰/۱ درصد همراه با۷۰ میلی گرم اسید سیتریک در۱۰۰ سی سی آب مقطر به مدت ۳ دقیقه استفاده کردند.در تحقیقی که گنجی مقدم و همکاران برای ضد عفونی ریز نمونه های گیزلا انجام دادند ابتدا با غوطه ورسازی در

الکل ۷۰٪ به مدت ۶۰ ثانیه عمل پیش استرلیزاسیون انجام دادند، سپس نمونه های استرلیزه شده را با آب مقطر آب کشی کردند، در مرحله بعد نمونه ها را در معرض ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد کلرید جیوه به مدت ۱ و ۲دقیقه قرار داند.

بوذری و همکاران برای ضد عفونی سطحی ریز نمونه های سنت لوسی (64 - SL) محلب،رشد یافته در گلخانه،به دلیل کوتیکول (cuticle)حساس وضعیف ازمحلول ۵۰٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد

پس از استقرار نمونه ها در شرایط درون شیشه ای و تشکیل شاخه ها به اندازه ی ۳ تا ۴ سانتی متر، از آنها برای پر آوری استفاده شد.

مرحله شاخه زایی به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملا تصادفی با۳ تیمار و ۸ تکرار مورد آزمایش قرار گرفت. به منظور ارزیابی اثر محیط کشت وتنظیم کننده رشد BAP،ریز نمونه ها در محیط کشت MS و غلظت های صفر،۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP کشت شدند .

صفات مورد ارزیابی شده طول نمونه ها ، تعداد شاخه ها ، طول شاخه های پرآوری شده و کیفیت نمونه ها بودند. ریز نمونه ها در شیشه های بزرگتر از مک کارتی کشت شدند و در هر شیشه یک نمونه کشت شد هر شیشه به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. تمام هورمون های استفاده شده به صورت تک هورمونی می باشد. دراین محیط ها تماماً از آگار۷ گرم در لیتر و ساکارز ۳ درصد استفاده شد و pH کلیه محیط ها ۵/۷ تا ۵/۸ می باشد

در این بررسی محیط MS با ۷ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیترساکارز و از هورمون BAP در سه تیمار جداگانه صفر، ۱، ۲ میلی گرم در لیتر و تیمارهای NAA شامل یک میلی گرم در لیتر و IBA شامل ۰/۸ ، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر استفاده شد.
تمام نمونه ها در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس و در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند . نمونه های کشت شده معمولا پس از ۶ تا ۷ روز شروع به رشد کردند .

یکی از عوارضی که در طول مدت کشت اولیه به استقرار نمونه ها اسیب زدو باعث از بین رفتن نمونه ها گردید، قهوه ای شدن بافت و محیط کشت بود.عوامل متعددی ازجمله برش و قطع کردن و هرنوع عملیاتی که باعث زخم بافت گردد سبب تولید پلی فنول اکسیداز شده که باعث قهوه ای شدن بافت می شود. بنابراین تا حد امکان باید از زخم کردن بافت اجتناب گردد.

هنگامی که ریز نمونه ها از گیاه چوبی (بافت چوبی) تهیه شدند قهوه ای شدن ریز نمونه ها خیلی شدید تر از زمانی بود که از گیاه علفی (بافت علفی) تهیه می شد. چون در هنگامی که بافت چوبی باشد مقدار فیتو هورمون اتیلن که با تولید ترکیبات فنولی در ارتباط است ، در گیاه به مقدار زیادتری وجود دارد .

یکی از راهکارهایی که می تواند از قهوه ای شدن ریز نمونه ها تا حدود زیادی جلوگیری کند ، قرار گرفتن ریز نمونه ها بلافاصله بعد از برش و زخم در تیمار ضدعفونی و شستشو با آب مقطر حاوی آنتی اکسیدان می باشد . این عمل باعث شسته شدن مواد فنلی ترشح شده میگردد.واکشت کردن مکرر و جدا کردن قسمت های قهوه ای از تجمع مواد سمی در داخل محیط کشت جلوگیری کرده و همچنین قبل از اینکه سلول های سالم بافت به مواد سمی فنلیکی قسمت های قهوه ای شده بافت و محیط کشت آلوده گردد ، از تاثیر آنها محفوظ می ماند.(Bonga,J.M,1982)

مقدار نور در این مرحله به حدود ۳۵۰۰ تا ۴۰۰۰ لوکس افزایش یافت و درجه حرارت مانند مرحله رشد طولی تنظیم شد در این آزمایش پس از ۴ هفته که رشد طولی شاخه ها تا اندازه ای کامل شد و قابل جدا شدن از یکدیگر گردید تعداد شاخه های تولید شده شمارش شد.

نتایج و بحث

بهترین نتایج با استرلیزاسیون نمونه ها با کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه به دست آمد، به طوری که تقریبا ۹۰ درصد کشت های استقرار یافته به دور از آلودگی بودند و ریزنمونه های کشت شده نیز رشد خوبی داشتند.

هرچند درصد آلودگی در تیمارهای ۴ و ۵ دقیقه صفر بود ، ولی تعداد ریز نمونه های فعال و قابل رشد به طور چشمگیری کاهش یافت.

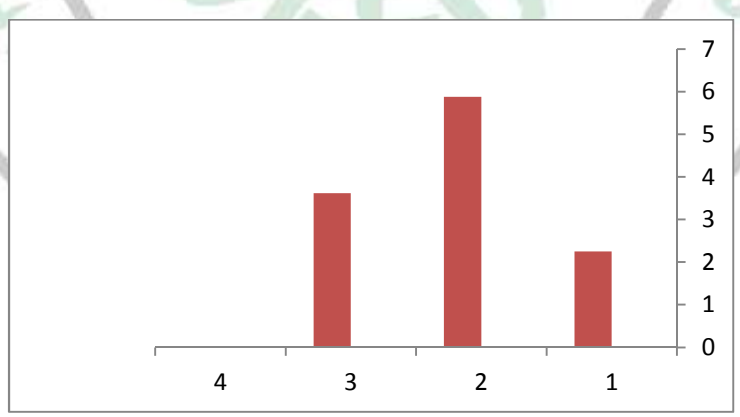
نتایج حاصله با نتایج " سپهوند و همکاران " در مورد استفاده از کلرید جیوه ۰/۱ درصد با تیمار ۳ دقیقه مطابقت دارد ولی محلول مورد استفاده شده برای شستشوی ریز نمونه ها حاوی ۷۰ میلی گرم اسید سیتریک در ۱۰۰ سی سی آب مقطر استریل بوده است .

نتایج مرحله تکثیر ریز نمونه ها نشان داد که محیط کشت MS حاوی ۱ میلی گرم BAP با میانگین شاخه زایی ۵/۹ بهترین نتیجه را دارد. و در تیمارهای صفر و ۲ میلی گرم BAP میانگین شاخه زایی به ترتیب ۲/۲۵، ۳/۶۲ می باشد.

هرچند افزایش غلظت BAP تا اندازه ای تعداد شاخه را بالا می برد ولی طول شاخه و اندازه برگ تا حدودی کاهش می یابد که این عارضه می تواند ناشی از کاهش تعداد جوانه های حاوی اکسین باشد و می تواند تاثیر زیادی در کاهش ریشه زایی شاخه های انتقال یافته به مرحله ریشه زایی داشته باشد.

جدول ۱: مقایسه میانگین میزان شاخه زایی دراثرکاربرد BAP به روش دانکن

غلظت	تعداد	زیر مجموعه ها	
		A	B
0	۸	۲/۲۵	
۲	۸	۳/۶۲	
۱	۸		۵/۸۸
معناداری آزمون		۰/۱۲۵	۱/۰۰۰



نمودار ۱. مقایسه میانگین تعداد ساقه ها با غلظت های متفاوت

منابع

۱. بوذری ناصر، مرتضی مهدویان و حمید عبداللهی(۱۳۸۹)-اثر محیط کشت و تنظیم کننده های رشد بر پرآوری و ریشه زایی پایه رویشی محلب (سنت لوسی ۶۴) – مجله بهنژادی نهال و بذر- شماره ۱:تهران

۲. بوذری ناصر، مریم تاتاری، منصوره کشاورزی(۱۳۸۸)-ارزیابی مقاومت به سرمازدگی زمستانه درتعدادی از ارقام تجاری و بومی گیلاس در شرایط کرج- ششمین کنگره علوم باغبانی ایران

۳. حاج نجاری، حسن (۱۳۷۳)، ریز ازدیادی، تهران: انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع
۴. دانشور حسینی ، علیرضا(۱۳۹۰)-اثرات کشت های محیطی و تنظیم کننده های رشد گیاهی بر ریزازدیادی پایه Gisela 6 - scholars Research library
۵. سپهوند ، صادق (۱۳۹۰)- بررسی روش های مختلف تکثیر غیر جنسی پایه رویشی بادام GF677 تهران: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران – پایان نامه کارشناسی ارشد رشته باغبانی.
6. Bonga, J.M. and Durzan, D.J.1982. Tissue culture in forestry .The Hague : Martinus Nijhoff, publishers, Netherland.
7. Huang ven Jiang, Journal of Natual Science., 2003, 26 (2), 161-16

To examine the growing roots of Gisela by tissue cuiture

R. Mirshamsi[1*], K. Kamali[2]

1- Student of agricultural biotechnology, Tehran Payamnoor University. 2- Mater of natural resources of Yazd University.

Abstract

Gisela is one type of half-short roots of sweet cherry that is changed to commercial roots today because of rapid output and produt of linkages , extensive compatibility , controlled and middle growth , good resistance to PDV,PNRSV,non biotype reproduction. The goal of this research is how to increase efficiency of reproduction of these roots via tissue culture.in this research used new sporouts of green house plants that dis infected with 0/1 mercury chloride to 3 minutes and washed with distillated water,herbages are choiced for longitudinall growth for these factors:culture medium of MS ,3% saccharose,0/75 akar,BAP %1 mlgr/lit,16 hours light,8 hourse dark ,24-25 temperature and %45 moisture.After 3 weeks herbages are shifted to branching medium. Cultivation of herbages are repeated every 21 days-the best branching is resulted in the MS medium with 1 mlgr/lit BAP hormone.

Key words: Tissue culture, Gisela, Root stock