استفاده از کتیرا و پرلیت به‌عنوان جایگزین آگار در محیط ریزافزایی پایه بادام GF677

زهرا مهدوی[۱]، شیرین دیانتی[۲] و سهیل کریمی[۳*]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران.

[۲و۳] استادیار گروه علوم باغبانی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران.

*نویسنده مسئول: skarimi@ut.ac.ir

چکیده

روش‌های ازدیاد درون شیشه‌ای از کارآمدترین روش‌های افزایش گیاهان است. ولی هزینه‌های زیاد این روش‌ها، استفاده و گسترش آن‌ها را برای افزایش تجاری گیاهان محدود می‌نماید. بخش عمده‌ای از هزینه‌های کشت بافت گیاهی مربوط به استفاده از آگار به‌عنوان ماده جامدکننده است. در این پژوهش امکان جایگزین نمودن آگار با مواد ارزان قیمت (کتیرا، پرلیت و ترکیب کتیرا و آگار، و کتیرا و پرلیت) در کشت ریزنمونه‌های پایه GF677 بادام ارزیابی شد. قلمه‌های تک گره گیاه در محیط کشت MS حاوی عوامل نیمه جامد کننده مختلف مستقر شدند و شاخص‌های رشد، بقاء و درصد آلودگی پس از ۴۵ روز ارزیابی شد. گرانروی ژل کتیرا کمتر از آگار بود که این امر سبب استقرار ضعیف‌تر ریزنمونه‌ها شد. استفاده از مخلوط کتیرا و سایر مواد سبب افزایش گرانروی محیط و عدم غوطه‌ورشدن ریزنمونه‌ها در محیط کشت شد. ریزنمونه‌ها به محیط پرلیت پاسخ خوبی دادند و رشد خوبی داشتند. درمجموع رشد و پرآوری شاخساره در محیط کشت حاوی کتیرا و پرلیت به‌خوبی محیط آگار بود، هرچند که درصد بقاء ریزنمونه در این محیط‌ها بیشتر از تیمار آگار بود. کمترین رشد درآمیخته پرلیت و کتیرا مشاهده شد. بر این اساس، استفاده از کتیرا یا پرلیت به‌عنوان مواد سازگار با محیط‌زیست و ارزان قیمت برای کاهش هزینه‌های صنعت کشت بافت گیاهی توصیه گردید.

کلمات کلیدی: **پایه بادام، پرلیت، جایگزین‌های آگار، ریزافزایی، کتیرا.**

مقدمه

پایه GF677 یک دانهال تصادفی است که در اواسط ۱۹۴۰ در فرانسه شناسایی و معرفی شد (Fernandez *et al.*,1994) و به‌عنوان اولین هیبرید هلو × بادام در سطح تجاری آزمایش و مورد استفاده قرار گرفت (Felipe *et al.*, 1998). سیستم ریشه‌ای این گیاه بسیار قوی و گسترده‌تر از والدین هلو یا بادام بوده، و استقرار خوبی را برای گیاه تأمین می‌کند. پایه‌های هیبرید هلو-بادام به بهترین شکل در شرایط با زهکشی خوب، و خاک‌های خشک و آهکی سازگار شده‌اند. این پایه‌ها تمایل به جذب سدیم کمتر نسبت به بادام و کلر کمتر نسبت به هلو دارند (Rom and Carlson, 1987). با توسعه روش‌های تکثیر رویشی مناسب، این پایه از سال ۱۹۷۵ به پایه غالب برای بادام و هلو در فرانسه تبدیل شد. در ایران نیز با توجه سازش خوب این پایه به شرایط خاک‌های آهکی و محیط خشک، استفاده از این گیاه به‌عنوان پایه به‌صورت قابل‌ملاحظه‌ای گسترش یافته است. با توجه به سخت ریشه‌دار شدن قلمه‌های این گیاه، عمدتاً از روش‌های افزایش درون شیشه‌ای برای ازدیاد گسترده این پایه استفاده می‌شود. ازاین‌رو، با بهینه‌سازی روش کار و کاهش هزینه‌های کشت درون شیشه‌ای می‌توان بازده اقتصادی و کارایی ازدیاد این گیاه را افزایش داد.

آگار گران‌ترین جزء محیط کشت بافت گیاهی است، ازاین‌رو جایگزین کردن این ماده با مواد ارزان قیمت می‌تواند سبب صرفه‌جویی اقتصادی قابل توجهی در فرآیند ازدیاد درون شیشه‌ای گیاهان گردد (Yamasaki and Osuga, 1960). فرآیند تولید و خالص‌سازی آن در کارخانجات ویژه و با صرف هزینه زیاد انجام می‌شود (Scholten and Pierik,

1998). آگار به‌عنوان عامل جامد کننده، ازجمله مواد پرکاربرد و گران‌قیمت در محیط کشت گیاهی محسوب می‌شود ولی قیمت گزاف و نگرانی کاهش منابع آن، جستجو برای یافتن جایگزینی کم‌هزینه را ضروری کرده است (Deb and Pongener, 2010). غیر از آگار، امکان استفاده از سایر منابع طبیعی به‌منظور تولید ژل در محیط‌های کشت وجود دارد. کتیرا عصاره به‌دست‌آمده از ساقه نوعی گون از جنس *Astragalus* است که به‌طور طبیعی در مناطقی از ایران، ترکیه و بعضی کشورهای دیگر رشد می‌نماید. این صمغ به‌عنوان پایدار کننده، امولسیون کننده و قوام دهنده در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی- بهداشتی کاربرد فراوانی دارد. پژوهش‌های اخیر امکان استفاده از این ماده به‌عنوان یک عامل ژل کننده محیط کشت را نشان داده‌اند (Karimi *et al.*, 2016). افزون بر مواد آلی، مواد معدنی نیز می‌توانند برای جامد کردن محیط کشت و تأمین استقرار ریزنمونه در محیط مورد استفاده قرار گیرند. پرلیت منبسط شده ماده‌ای سبک و متخلخل و با pH خنثی است. این ماده با حرارت دادن سنگ آتش‌فشانی سیلیکات آلومینیوم در دمایی نزدیک به ۸۶۰ تا ۱۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به دست می‌آید. تخلخل زیاد این ماده می‌تواند در محیط درون شیشه‌ای افزون بر تأمین آب و مواد غذایی، سبب تهویه مناسب نیز شود. ازاین‌رو، در پژوهش حاضر تلاش شد تا با جایگزین نمودن آگار با مواد جامدکننده ارزان قیمت، هزینه‌های تولید پایه GF677 در کشت درون شیشه‌ای کاهش داده شود و کارایی این مواد نسبت به آگار در بهبود کارایی ازدیاد این گیاه ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) استفاده شد. محیط به‌دست‌آمده بر اساس نوع ماده جامد کننده به ۴ محیط کشت تقسیم شد. ۱) کتیرا به غلظت ۳ درصد ۲) پرلیت با دانه‌هایی به قطر ۳-۵ میلی‌متر به مقدار ۱۵ گرم در ۲۰ میلی‌لیتر ۳) آمیخته کتیرا و پرلیت، ۴) آمیخته کتیرا و آگار و ۵) محیط کشت حاوی آگار به غلظت ۷ گرم در لیتر (شاهد). دانه‌های پرلیت پیش از استفاده در محیط کشت، ابتدا شسته و خشک شدند و سپس به محیط کشت اضافه شدند. در تیمار آمیخته کتیرا و پرلیت، ابتدا کتیرا با غلظت ۳ درصد به محیط کشت اضافه شد و سپس به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر به ظروف حاوی ۱۵ گرم پرلیت اضافه گردید. در تیمار آمیخته کتیرا و آگار محیط MS با آگار ۱ درصد و کتیرا ۳ درصد تهیه و به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر در ظروف کشت توزیع شد. جهت گندزدایی، محیط‌های کشت داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه و فشار۱/۲ کیلوگرم بر سانتی‌متر قرار داده شدند. محیط حاوی آگار در زیر هود لامینار در ظروف کشت توزیع شد. هر یک از محیط‌های آماده شده با ۴ تکرار به تعداد ۳ گیاه در اندازه‌های یکسان در هر شیشه کشت شد. شیشه‌ها در اتاقک رشد و فتوپریود ۱۶-۸ ساعت روشنایی نگهداری شدند. پس از ۴۵ روز درصد بقاء و شاخص‌های رشد گیاهان ارزیابی شد. کیفیت کلی گیاه با امتیاز دادن به گیاهان (از صفر تا ۳) درون هر شیشه مشخص گردید.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تکرار انجام شد. چهار عدد گیاه در اندازه‌های یکسان در هر شیشه کشت شد و میانگین این گیاهان به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه قرار گرفت. مقایسه میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

در طی چند دهه اخیر تلاش‌های زیادی در جهت یافتن مواد جایگزین آگار انجام شده است و به‌این‌ترتیب مواد مختلفی نیز معرفی شدند (Karimi *et al.*, 2016). ازجمله مواد جامد کننده جایگزین آگار می‌توان به کاراژینان (Lines,1977)، آلژینات (Scheurich *et al.*, 1980)، فیکول (Kao, 1981)، ژلرایت (Pasqualetto *et al.*, 1988)، و نشاسته (Rahimbaev and Nene *et al.*,1996;) اشاره نمود. نشاسته، ارزان‌ترین عامل جامدکننده محیط کشت است که به دلیل کیفیت پایین ژل، شفافیت کم آن نسبت به آگار و تجزیه و مصرف شدن توسط گیاه، که باعث نرم شدن محیط در طول دوره کشت می‌شود، موردپذیرش جهانی قرار نگرفته است (Jain and Babbar, 2002).

در پژوهش حاضر بیشترین طول نوساقه در تیمارهای آگار، کتیرا و آگار+کتیرا مشاهده شد که به‌صورت معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود «جدول ۱». بیشترین تعداد برگ نوساقه متعلق به آگار+کتیرا بود و کمترین تعداد برگ در تیمار پرلیت+کتیرا مشاهده شد «جدول ۱». گیاهان در محیط حاوی کتیرا درصد بقاء «جدول ۱» و رشد بهتری داشتند که همان‌گونه در پژوهش Karimi و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده شد، این مهم می‌تواند ناشی از وجود مواد مغذی و تنظیم‌کننده‌های رشد در این ماده باشد. جهت بهبود استحکام ژل کتیرا، این ماده در ترکیب با مقدار بسیار کمی آگار نیز استحکام قال قبولی در حد تیمار آگار ایجاد کرد. علاوه بر این، بهره‌وری و رشد گیاه به‌دست‌آمده روی این محیط ترکیبی آگار و کتیرا بهتر از محیط آگار بود. پیش‌ازاین نیز از ترکیب عوامل جامدکننده ارزان قیمت با آگار برای کاهش هزینه‌های کشت بافت استفاده شده است. به‌عنوان نمونه برای افزایش استحکام محیط‌ها، ترکیبی از آگار (۰/۲ و ۰/۳ درصد) و کتیرا (۲ و ۳ درصد) استفاده شد که ویسکوزیته محیط ترکیبی به‌خوبی محیط کشت حاوی ۰/۸ درصد آگار بود (Karimi *et al.*, 2016). برای افزایش استحکام محیط جامد شده با صمغ گیاه *Cochlospermum religiosum* از ترکیب‌های مختلف آگار (۰,۶-۰,۲ درصد) و عامل ژل کننده (۳-۱ درصد) استفاده شد (Jain and Babbar, 2002). همچنین نشاسته کاساوا مخلوط با ۰/۲۵ درصد آگار استحکامی در حد تیمار آگار ۰/۸ درصد را ایجاد نمود. استفاده از ۱۰درصد نشاسته کاساوا ۴۲/۵ درصد، هزینه‌ها را در مقایسه با استفاده از آگار کاهش داد ولی شفافیت محیط حاوی نشاسته کاساوا در مقایسه با آگار کمتر بود و از این نظر موردپذیرش قرار نگرفت (Kuria *et al.*, 2008). این در حالی بود که، ژل حاصل از کتیرا شفافیت زیادی در حد آگار داشت. شفافیت زیاد ژل برای ارزیابی مداوم سلول ها، بافت‌ها یا اندام‌های در حال رشد در داخل محیط کشت اهمیت فراوانی دارد (Jain and Babbar, 2002). پیش‌ازاین نیز به شفافیت محیط کشت‌های جامد شده با کتیرا اشاره شده بود (Karimi *et al.*, 2016).

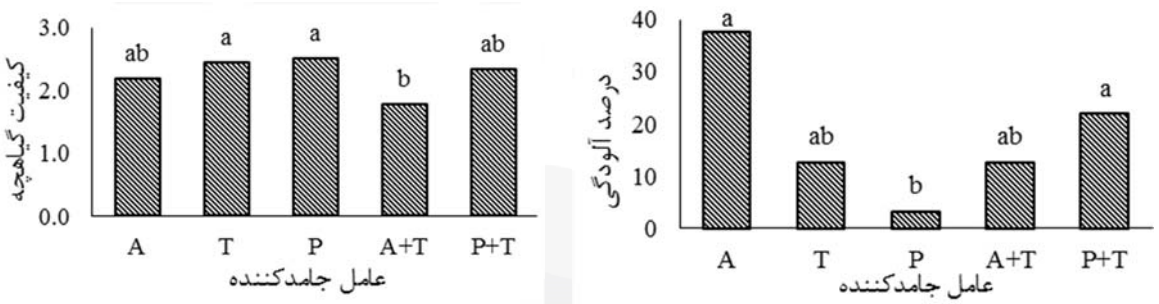
جدول ۱- اثر نوع عامل جامد کننده بر شاخص‌های رشد و درصد بقاء ریزنمونه‌های GF677.

عامل جامد کننده	طول نوساقه (mm)	تعداد برگ نوساقه	درصد بقاء ریزنمونه
آگار	۲/۶۸^{a}	۳/۰۶^{ab}	۶۲/۵^{b}
کتیرا	۱/۳۲^{ab}	۲/۸۴^{ab}	۸۷/۵^{a}
پرلیت	۰/۹۰^{b}	۲/۱۹^{ab}	۹۶/۸^{ab}
آگار+کتیرا	۱/۱۸^{ab}	۴/۵۹^{a}	۸۷/۵^{a}
پرلیت+کتیرا	۰/۵۹^{b}	۱/۶۴^{b}	۶۵/۶^{ab}
ANOVA	**	*	*

** و *: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد؛ مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن ($P > ۰/۰۵$).

درصد آلودگی هر ۴ تیمار از شاهد کمتر بود و کمترین درصد آلودگی مربوط به تیمار پرلیت بود «شکل ۱». احتمالاً گسترش بیشتر آلودگی‌های درون شیشه‌ای در تیمار آگار سبب کاهش درصد بقاء ریزنمونه‌ها در این محیط شد. کیفیت ظاهری شاخص مناسبی در ارزیابی کارایی محیط کشت در حمایت از رشد و نمو ریزنمونه‌ها است. در آزمایش حاضر اثر تیمارها بر کیفیت گیاهچه‌های GF677 در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین کیفیت گیاهچه متعلق به تیمار پرلیت و کتیرا و پس از آن به ترتیب متعلق پرلیت+کتیرا، آگار و آگار+کتیرا بود «شکل۱». این نتایج با یافته‌های پژوهش Karimi و همکاران (۲۰۱۶) در یک راستا قرار دارد. ولی مشخصاً در پژوهش حاضر استفاده از پرلیت نیز نتایج بسیار خوبی در پرآوری و رشد گیاهان در پی داشت. پرلیت با توجه به قیمت ناچیزی که در مقابل کتیرا دارد، می‌تواند به‌عنوان ارزان‌ترین عامل جامدکننده در محیط کشت بافت گیاهی، جایگزین آگار شود.

درمجموع، با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان استفاده از مـوادی همچـون پرلیـت و کتیـرا را بـه‌جای آگـار در محیط کشت پیشنهاد نمود. پرلیت افزون بر ارزان و در دسترس بودن می‌تواند با افزایش اکسیژن‌رسانی به گیـاه سـبب بهبود رشد و نمو گیاهچه در شرایط درون شیشه‌ای شود. دانه‌های پرلیت استقرار مناسبی برای گیاه فراهم می‌کند کـه این ویژگی نسبت به کتیرا یک مزیت نسبی است. علاوه بر این با توجه به اینکه پرلیت محیط را کاملاً جامد نمی‌کنـد و مواد غذایی و هورمون‌ها در محیط آب‌گونه هستند، امکان پر کردن مجدد محیط با مواد مغذی، کنترل بهتر pH، بـدون ایجاد مشکل برای بافت فراهم می‌شود و افزون بر این مواد غذایی برای مدت بیشتری برای گیـاه در دسـترس خواهنـد بود (Pullman and Skryabina, 2007).کتیرا نیز نسبت به آگار یک منبع در دسترس تر است که منابع آن قابل تجدید هستند و حضور آن رشد گیاه را افزایش می‌دهد، هرچند که گرانوی آن کمتر از آگار است.



شکل ۱- اثر نوع عامل جامد کننده بر درصد آلودگی و کیفیت ریزنمونه‌های GF677. A) آگار، T) کتیرا، P) پرلیت، A+T) آگار+کتیرا، P+T) پرلیت+کتیرا. بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن تفاوت بین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

منابع

Deb, C. R. and Pongener, A. 2010. Search of alternative substratum for agar in plant tissue culture. Current Science; 98:99-102.

Felipe, A.J., J. Gomez-Aparisi, and R. Socias i Company. 1998. Breeding almond × peach hybrid rootstocks at Zaragoza (Spain). Acta Hortic; 470: 195-199.

Fernandez, C., J. Pinochet, D. Esmenjaud, G. Salesses, and A. Felipe. 1994. Resistance among new *Prunus* rootstocks and selections to root knot nematodes in Spain and France. HortScience; 29: 1064-1067.

Jain, N. and Babbar, S. B. 2002. Gum katira–a cheap gelling agent for plant tissue culture media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 71**,** 223-229.

Kao, K.N., 1981. Plant formation from barley anther cultures with ficoll media. Z. Pflanzenphysiol; 103: 437–443.

Karimi, S., Salehi, H. and Ashiri, F. 2016. Tragacanth, a novel and cheap gelling agent in carnation and miniature rose tissue culture media. Journal of Ornamental Plants; 6**,** 253-260.

Kuria, P., Demo, P., Nyende, A.B. and Kahangi, E.M. 2008. Cassava starch as an alternative cheap gelling agent for the *in vitro* micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum L.*). African Journal of Biotechnology, *7*(3): 301-307.

Lines AD. 1977. Value of the K^+ salt of carageenan as an agar substitute in routine bacteriological media. Appl. Environ. Microbiol; 34: 637–639.

Nene Y.L., Shiela V.K. and Moss J.P. 1996. Tapioca – A potential substitute for agar in tissue culture media. Current Science; 70: 493–494.

Pasqualetto PL, Zimmerman RH and Fordham IM. 1988. The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult; 14: 31–40.

Pullman, G. S. and Skryabina, A. 2007. Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. Plant Cell Reports; 26**,** 873-887.

Rom, R.C. and R.F. Carlson. 1987. Rootstock for fruit crops. John Wiley & Sons. New York; 494 p.

Scheurich P, Schabl H, Zimmerman U and Klein J. 1980. Immobilisation and mechanical support of individual protoplasts. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes; 598: 645–651.

Scholten, H. and Pierik, R. L. M. 1998. Agar as, a gelling agent: differential biological effects *in vitro*. Scientia Horticulturae, 77, Issues 1-2: 109-116.

Yamasaki, H. and Osuga, G. 1960. Studies on the propagation of Gelidiaceus algae on the ratio of cystocarposporophyte to tetrasporophyte in *Gelidium mansii* on the artificial, stone bed. Bull. The Japanese Society of Fish; 26: 9-12.

Using Tragacanth and Perlite as Agar Substitutes in Micropropagation Medium of Almond Rootstock GF677

Zahra Mahdavi[1], Shirin Dianati[2], Soheil Karimi[3]*
[1*] MSc Student of Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.
[2,3] Assistant Professor of Department of Horticulture, College of Aburaihan, University of Tehran.
[*]*Corresponding Author: skarimi@ut.ac.ir*

Abstract

In vitro **propagation is one of the most efficient techniques for multiplication of valuable plants. High cost of these techniques, however, limits their use and development in commercial production of plants. A major portion of plant tissue culture costs is associated with the use of agar as gelling agent. The current study was aimed to evaluate low cost materials (tragacanth gum, perlite, and mixture of tragacanth and agar, and perlite) as agar substitutes in almond rootstock GF677 propagation medium. 45 days after establishment of nodal segments on the MS medium containing different solidifying agents, growth indices, survival rate, and contamination percentage of the explants were evaluated. The growth and proliferation on tragacanth and perlite containing media were as well as agar medium, however, the explant survival on these media was higher than the agar medium. Viscosity of tragacanth-gelled media was less than the agar-gelled media, which led to less establishment of the explant on these media. Using tragacanth in mixture with the other materials resulted in acceptable viscosity of media and provided suitable anchorage for establishment of the explants. The explants responded well to the perlite containing media and showed a vigorous growth. The lowest growth was observed on the mixture of perlite and tragacanth. Accordingly, tragacanth gum or perlite were suggested as environmental friendly and low cost substitutes for agar in plant tissue culture industry.**

Keywords**: Agar substitutes. Almond rootstock, Gum tragacanth, Micropropagation, Perlite.**