ریزازدیادی درون شیشه‌ای کارآمد فندق (*Corylos avellana* L.)

حمید محمدزاده مطلق[*1]، مراد جعفری [2]

[*1] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

[2] دانشیار گروه گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

نویسنده مسئول: Hakanmotlagh9@gmail.com

چکیده

فندق (*Corylus avellana*)، متعلق به خانواده Betulaceae، چهارمین محصول خشکبار مهم دنیا از نظر اقتصادی است. فندق به دلیل داشتن ترکیبات اسیدچرب منحصر به‌فرد به‌طور عمده غنی از چربی‌های غیراشباع، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات شیمیایی فعال زیستی، نقش مهمی در تغذیه و سلامت انسان ایفا می‌کند. تکثیر کلونی ژنوتیپ‌های گزینش شده، یک گام حیاتی برای تکثیر مواد ژنتیکی بهبود یافته در برنامه‌های اصلاحی درختان است. تکنیک‌های ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای یک رویکرد کارآمد برای تکثیر سریع و گسترش ارقام جدید و بهتر فندق فراهم می‌کند. در این تحقیق، شاخه‌های نیمه‌خشبی حاوی جوانه جانبی، به‌عنوان ریزنمونه برای ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. برای فراهم کردن یک سیستم باززایی کارآمد، محیط پایه WPM همراه با سطوح مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه (BAP, IBA, IAA) و همچنین آهن نوع Sequestrene 138 (Fe-EDDHA) و استیل‌سالسیلیک‌اسید (ASA) مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام ترکیبات تیمار تنظیم کننده‌های رشد القای شاخساره و باززایی مشاهده شد، با این وجود، بیش‌ترین درصد باززایی شاخساره (۸۳/۱۵ درصد) در محیط کشت غنی شده با BAP ۵ mg/L، ASA ۲ mg/L و آهن Sequestrene 138 ۱۰۰ mg/L مشاهده گردید. بیش از ۹۰ درصد از شاخه‌های باززا شده، با غوطه‌ور کردن بخش پایه شاخه به مدت ۱۰ ثانیه در محلول IBA ۱۰۰۰ mg/L و کشت در محیط بدون اکسین، ریشه‌دار شدند. گیاهان تکثیر یافته به طور موفقیت‌آمیز به شرایط بیرون سازگار شدند. این مطالعه شاید یک پروتکل ساده برای ریزازدیادی فندق در مقیاس بزرگ تجاری را فرآهم کند.

کلمات کلیدی: باززایی جوانه شاخساره، فندق (*Corylos avellana* L.)، ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای، محیط WPM

مقدمه

فندق (*Corylus avellana*) متعلق به خانواده بتولاسه است که در مناطقی از اروپا و آسیای میانه با زمستان‌های معتدل و مرطوب و تابستان‌های خنک به صورت خودرو رشد می‌کند (Olsen, 2003). قسمت‌های مختلف گیاه فندق حاوی متابولیت‌های ثانویه متعددی با خواص دارویی و ضد میکروبی بسیار با ارزش است و از جمله این متابولیت‌ها می توان به تاکسول با اثرات ضد سرطانی اشاره نمود (Hoffman *et al.*, 1998). تولید این متابولیت (تاکسول) در مقادیر کم در بخش‌های مختلف گیاه فندق گزارش شده است (safari *et al.*, 2012).

اولین گام در دستیابی به متابولیت‌های ثانویه، تولید گیاه مناسب و به مقدار کافی است که نیازمند زمان و هزینه بالا می‌باشد. تکثیر در شرایط درون شیشه‌ای زمان دستیابی به تعداد زیادی گیاه با یکسانی ژنتیکی بالا را کوتاه‌تر می‌کند و تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای نسبت به استخراج آن از گیاهان موجود در طبیعت دارای بهره‌وری بیشتری است (Tripathi and Tripathi, 2003). همچنین برای تحقیقات بیشتر روی ترکیبات بیوشیمیایی و ارزش‌های دارویی بالقوه، بهینه سازی سیستم باززایی درون شیشه‌ای مورد نیاز است. لذا هدف پژوهش حاضر، بهینه‌سازی پرآوری و تعیین مناسب‌ترین محیط‌کشت و تنظیم‌کننده رشد گیاهی برای پرآوری درون شیشه‌ای فندق می‌باشد.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و ضدعفونی: در این پژوهش، شاخه‌های نیمه خشبی حاوی یک جوانه جانبی دورمانت از درختان فندق در اواسط بهار از محوطه دانشگاه ارومیه جمع آوری و به عنوان ریزنمونه استفاده شدند. نمونه‌های گیاهی پس از جمع-آوری، پنج دقیقه با مایع ظرفشویی شستشو شده و به مدت یک ساعت زیر آب جاری قرار داده شدند، سپس ریزنمونه‌ها در زیر هود لامینار به مدت ۳۰ ثانیه داخل الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور شده و بلافاصله چندین مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند، به دنبال آن، ریزنمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه داخل این محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد غوطه‌ور و به دنبال آن چندین مرتبه آبکشی گردیدند و در نهایت ریزنمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل آب اکسیژنه ۱۰ درصد قرار داده شدند و مجددا آبکشی شدند. پس از ضدعفونی سطحی، برای کاهش آلودگی‌های باکتریایی، ریزنمونه‌ها به مدت یک ساعت داخل محلول حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (Cefotaxime) و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Streptomycin) و ریفامپین (Rifampin) غوطه‌ور و پس از آبکشی و گرفتن آب اضافی روی کاغذ صافی‌های استریل، در محیط‌کشت مورد نظر کشت داده شدند.

تاثیر تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی درون شیشه‌ای فندق

برای تکثیر دورن شیشه‌ای فندق، شاخه‌های نیمه خشبی حاوی یک جوانه جانبی دورمانت ضدعفونی شده در محیط کشت WPM (McCown and Lloyd, 1981) غنی شده با غلظت‌های مختلف فیتو هورمون‌ها (جدول ۱) کشت داده شدند. کشت‌ها در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از دو هفته درصد شاخساره‌زایی تعیین شد. همچنین برای ریشه‌زایی، بخش پایه شاخساره‌های باززا شده پس از برش مورب، در محلول IBA ۱۰۰۰ mg/L به مدت ۱۰ ثانیه فرو برده و سپس در محیط کشت بدون اکسین کشت شدند.

تجزیه و تحلیل های آماری

آزمایشی مربوط به تیمارهای باززایی به صورت طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم-افزار SAS 9.2 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت.

جدول ۱- ترکیبات و تنظیم‌کننده‌های رشد استفاده شده در تکثیر درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های تک گره فندق.

نام محیط کشت	ترکیبات هورمونی (mg/L)	ASA (mg/L)	آهن Sequestrene 138 (mg/L)	آسکوربیک اسید (mg/L)	زغال فعال (mg/L)
WPM_1	۵ BAP	۲	۱۰۰	۱۵۰	-
WPM_2	۵ BAP + ۰/۱ IBA	۲	۱۰۰	۱۵۰	-
WPM_3	۵ BAP + ۰/۱ IBA	-	۱۰۰	۱۵۰	-
WPM_4	۵ BAP + ۰/۱ IBA	-	-	۱۵۰	۰/۵
WPM_5	۲/۵ BAP +۰/۲ IBA	-	-	۱۵۰	۰/۵
WPM_6	۲/۵ BAP + ۰/۲ IAA	-	-	۱۵۰	۰/۵

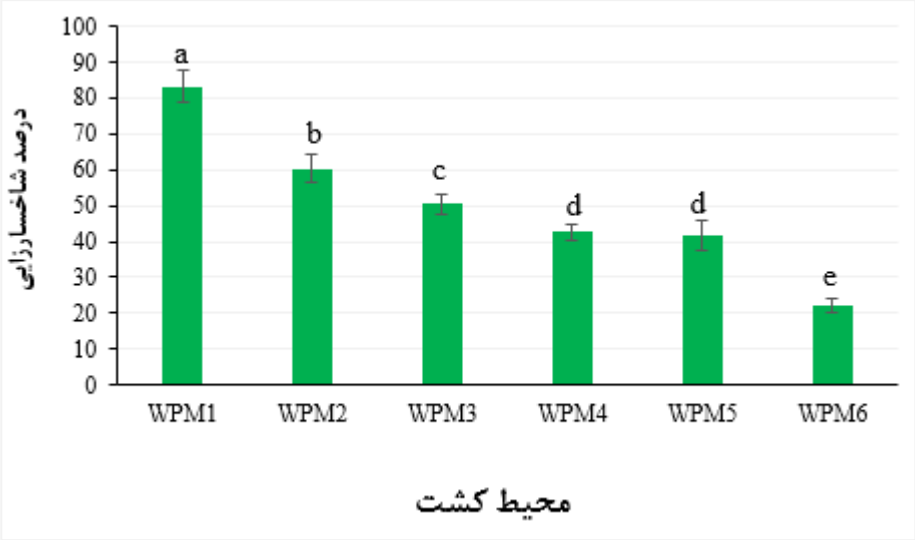
نتایج و بحث

اثر فیتوهورمون‌ها بر میزان شاخساره‌زایی

با کشت شاخه‌های نیمه خشبی حاوی یک جوانه جانبی دورمانت در محیط کشت‌های مختلف، در همه محیط‌کشت‌ها القای جوانه و شاخساره‌زایی انجام شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها (نمودار۱) نشان داد که در محیط‌کشت WPM بین ترکیبات و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از نظر میزان شاخساره‌زایی تفاوت معنی‌دار آماری ($P < ۰/۰۵$) وجود داشت، به‌طوریکه بیش-

IrHC2019

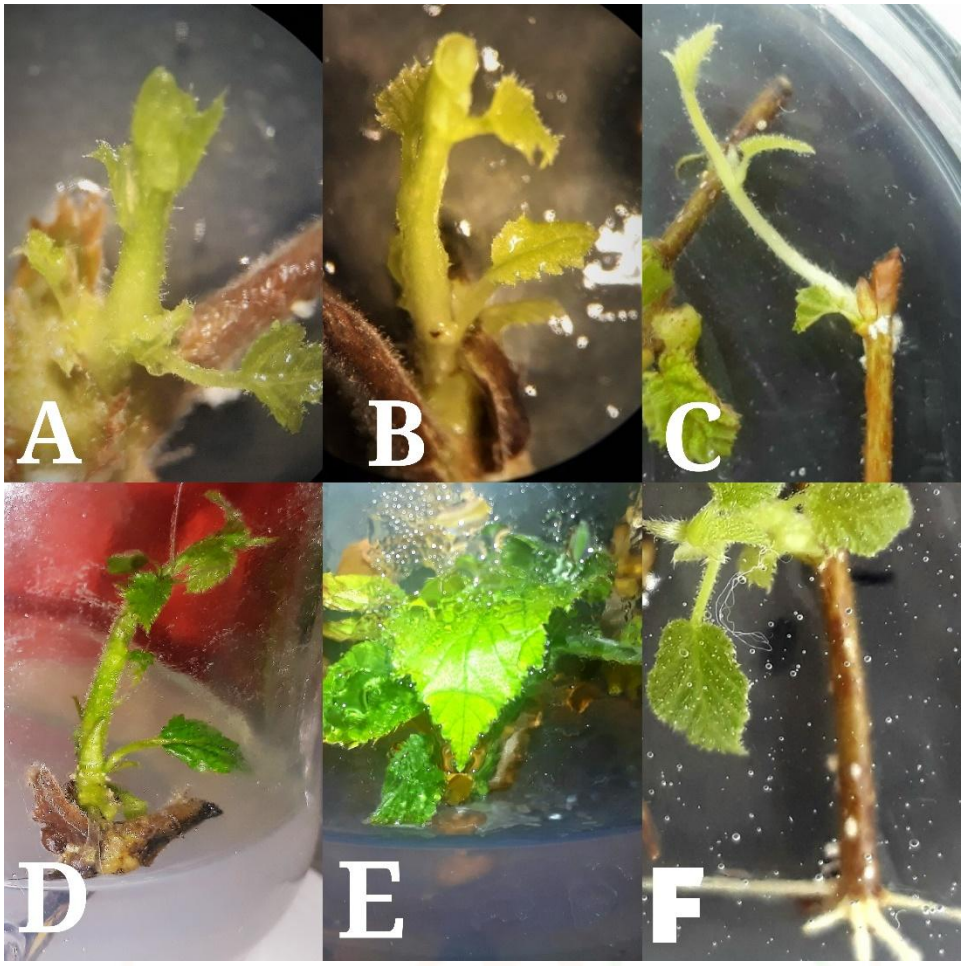
ترین درصد شاخساره‌زایی (۸۳/۱۵ درصد) مربوط به محیط‌کشت WPM_1 حاوی BAP ۵ mg/L ، ASA ۲ mg/L و ۱۰۰ آهن Sequestrene 138 بود، در حالیکه کم‌ترین میزان شاخساره‌زایی (۲۱/۹۷ درصد) در محیط‌کشت WPM_6 حاوی BAP ۲/۵ mg/L و IAA ۰/۲ mg/L مشاهده گردید. حضرتی‌جهان و همکاران (۱۳۹۶) در کشت درون‌شیشه‌ای تک گره فندق، بیش‌ترین تعداد شاخساره‌زایی در محیط‌کشت MS حاوی ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به‌همراه ۰/۰۵ mg/L IBA و همچنین در محیط‌کشت MS حاوی TDZ ۲/۵ mg/L و IBA ۰/۰۵ mg/L گزارش کردند. همچنین دریانی (۱۳۹۱) بیش‌ترین درصد شاخساره‌زایی (۶۶/۶۷ درصد) را در ریزنمونه‌های ساقه فندق (حاوی جوانه جانبی و انتهای)، در محیط کشت MS حاوی BAP ۳ mg/L بدست آوردند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که غلظت تقریبا بالای BAP همراه با استیل سالیسیلیک اسید (ASA) و آهن نوع Sequestrene 138 باعث افزایش شاخساره‌زایی در فندق می‌شود، در حالیکه آهن به فرم FeNaEDTA و ذغال فعال تاثیر قابل توجهی در شاخساره‌زایی نداشتند. شکل ۱ نمونه‌هایی از جوانه‌های القا شده و باززایی شاخساره‌ها در محیط WPM_1 را نشان می‌دهد.



نمودار ۱- درصد شاخساره‌زایی در محیط‌کشت پایه WPM حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد مختلف (جدول ۱).

ریشه‌دار شدن گیاهان درون شیشه‌ای از مهم‌ترین و حیاتی‌ترین مراحل تولید درون شیشه‌ای فندق در مقیاس وسیع با هدف تولید تجاری می‌باشد. در تحقیق حاضر ریشه‌زایی با فراوانی بالای ۹۰ درصد از تیمار گیاهچه‌های بازازشده با محلول حاوی IBA ۱۰۰۰ mg/L و سپس کشت در محیط‌کشت بدون اکسین مشاهده شد. گیاهان ریشه‌دار شده با موفقیت و زنده-مانی ۱۰۰ درصد به محیط گلخانه‌ای سازگار شدند.

IrHC2019



شکل ۱- نمونه‌هایی از جوانه‌های القاء شده در محیط‌کشت WPM_1. A و B : جوانه‌های جانبی القاء شده، C : رشد شاخساره پس از القای جوانه، D و E : گیاهچه‌های منتقل شده به محیط جدید برای رشد بیشتر، F : نمونه‌ایی از گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با غوطه ور کردن در محلول IBA (۱۰۰۰ mg/L) به مدت ۱۰ ثانیه.

منابع

حضرتی‌جهان، ر.؛ دژستان،س.؛ شیخ‌زاده مصدق،پ. و فرجامی‌نژاد، م. ۱۳۹۶. تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر رشد درون شیشه‌ای فندق (*Corylus avellana*) و تولید تاکسول در کالوس. مجله پژوهش‌های گیاهی (ایران مجله زیست شناسی)، جلد ۳۰، شماره۳.

دریانی، پ. ۱۳۹۱. بررسی تاثیر محیط‌های کشت و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی مختلف در ریزازدیادی درونشیشه‌ای فندق. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، ۸۹ صفحه.

مقصودی، شهرام. ۱۳۸۹. فندق (کشاورزی، صنعت، تغذیه و درمان) .ویرایش اول، علم کشاورزی ایران، تهران، ایران : ۱۰۷ صفحه

Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W. 2005. Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils. Journal of Agricultural Food Chemistry, 53: 4843-4852

IrHC2019

Geng S, Ma M, Ye HC, Liu BY, Li GF and Cong K. Effect of ipt gene expression on the physiological and chemicalcharacteristics of Artemisia annua L. Plant Sci. 2001; 160: 691 - 8.

Hoffman, A., Khan, W., Worapong, J., Strobel, G., Griffin, D., Arbogast, B. 1998. Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts-Using High Performance Liquid Chromatography- Thermospray Mass Spectrometry to Detect the Anticancer Agent and its Related Metabolites in. Spectroscopy-Eugene, 13(6): 22-32.

McCown BH and Lloyd G (1981) Woody Plant Medium (WPM)-A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. HortScience, 16, 453-453.

Olsen, J.L., 2002. Growing hazelnuts in the Pacific Northwest. Extension Service, Oregon State University.

Safari, M., Ghanati, F., Hajnoruzi, A., Rezaei, A., Abdolmaleki, P. and Mokhtari-Dizaji, M., 2012. Maintenance of membrane integrity and increase of taxanes production in hazel (*Corylusavellana* L.) cells induced by low-intensity ultrasound. Biotechnology letters, 34(6), pp.1137-1141.

Tripathi L, Tripathi JN (2003). Role of biotechnology in medicinal plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2: 243-253.

Efficient *in vitro* micropropagation of hazelnut (*Corylos avellana* L.)

Hamid Mohammadzadeh Motlagh[1]*, Morad Jafari[2]

[1*] MSc student of Biotechnology, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia

[2] Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia

[*]*Corresponding Author: Hakanmotlagh9@gmail.com*

Abstract

Hazelnut (*Corylus avellana*), belonging to the Betulaceae family, is the 4th economically important nut crop. Hazelnut plays a major role in human nutrition and health because of its unique fatty acid composition predominantly monounsaturated fatty, vitamins, antioxidants, and bioactive phytochemicals. The clonal propagation of selected genotypes is essential step for the replication of improved genetic materials in the tree breeding programmes. *In vitro* micropropagation techniques provide an efficient approach for rapid propagation and distribution of hazelnut new and elite cultivars. In this study, semi-hardwood branches containing an axillary bud were used as explants for *in vitro* propagation. To establish an efficient regeneration system, basal WPM medium with different levels of plant growth regulators (BAP, IBA, IAA) as well as Sequestrene 138 Fe (Fe-EDDHA) and acetylsalicylic acid (ASA) were evaluated. All combinations of the PGRs showed shoot induction and regeneration, however, the highest percentage of shoot regeneration (83.15%) was observed on medium supplemented with 5 mg/L BAP, 2 mg/L ASA and 100 mg/L Sequestrene 138 Fe. More than 90% of regenerated shoots were rooted by immersing the basal portion of shoot for 10 seconds in 1000 mg/l IBA followed by culturing in auxin-free medium. The propagated plants were successfully acclimatized to *ex vitro* conditions. This study might provide a simple protocol for large-scale commercial micropropagation of hazelnut.

***Keywords*:** Hazelnut (*Corylos avellana* L.), *In vitro* micropropagation, Shoot bud regeneration, WPM medium

IrHC2019