بررسی اثر محیط کشت‌های پایه و آسکوربیک اسید بر استقرار و میزان نکروزه شدن مریستم *Cerasus avium* (L.)

پریسا جنوبی[۱*]، ناصر بوذری[۲]، احمد مجد[۳]، مریم ملکـی[۴]
[۱] دانشیار، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی کرج
[۲] دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی کرج
[۳] استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی کرج
[۴] کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی کرج
[*] نویسنده مسئول: Maryam.maleki6996@yahoo.com

چکیده

استقرار اولیه مریستم‌ها یکی از مراحل مهم در پروسه کشت درون شیشه‌ای به‌منظور تولید گیاهان عاری از ویروس است. موفقیت در بهینه‌سازی محیط کشت در مرحله استقرار، ادامه کشت برای پرآوری نمونه را تضمین می‌کند. ازآنجایی‌که استقرار مریستم در محیط کشت تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی مانند محیط پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد و زمان نمونه‌گیری می‌باشد. این پژوهش به‌منظور تعیین محیط کشت پایه بهینه برای استقرار و بررسی میزان نکروزه شدن گیلاس انجام شده است. بدین منظور مریستم‌های برگرفته از جوانه‌های رأسی و جانبی در چهار محیط کشت پایه QL, MS, SH و B_5 با غلظت‌های صفر و یک میلی‌گرم بر لیتر حاوی آسکوربیک اسید و ترکیب هورمونی BA به میزان یک میلی‌گرم بر لیتر استقرار یافتند. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که مریستم‌ها در محیط کشت پایه QL حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید بیشترین درصد استقرار را نشان دادند.

کلمات کلیدی:* کشت مریستم، گیاه عاری از ویروس، قهوه‌ای شدن، بهینه‌سازی، *گیلاس

مقدمه

گیلاس با نام علمی *Cerasus avium* (L.) متعلق به تیره‌ی *Rosaceae* است. در قسمت‌های جنوبی نیمکره‌ی شمالی در مناطق معتدله می‌روید و بومی مناطق جنوبی دریای خزر و دریای سیاه است (Hartmann *et al.*, 1990). گیلاس غنی از آنتی‌اکسیدان و آنتی‌سیانین است و برای پیشگیری از استرس اکسیداتیو و بهبود ناشی از التهاب و ورم مفاصل مصرف می‌شود (Traustadtir *et al.*, 2004). برخی ترکیبات یافت شده در گیلاس نظیر پریلیل الکل، الاژیک اسید و کوئرسیتین ثابت شده است که در جلوگیری از روند شروع و گسترش سرطان نقش دارند (James & Belager, 1998). گیلاس یکی از مهم‌ترین محصولات باغی است و از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. ایران سومین کشور تولید کننده‌ی گیلاس در جهان با تولید ۲۲۵،۰۰۰ تن در سال است (FAO, 2012). تا اوایل دهه ۸۰ ایران رتبه نخست تولید گیلاس در جهان را داشت اما متأسفانه در حال حاضر به دلیل برخی مشکلات در عملیات به‌زراعی، آفات و بیماری‌های ویروسی، کشور در تولید گیلاس به رتبه سوم در جهان رسیده است. با توجه به ویژگی‌های مطلوب گیلاس، به‌منظور تولید میوه‌ای با کیفیت بالا، ظاهری سالم و کاهش خسارات ناشی از بیماری‌های ویروسی در سطح کشت ضروری است نسبت به تکثیر انبوه میوه‌ی سالم اقدام شود. بنابراین با استفاده از تکنیک‌های نوین از جمله کشت بافت امکان ازدیاد گیاهان فراهم می‌شود، به‌خصوص کشت مریستم که به‌منظور تکثیر انبوه گیاهان عاری از ویروس حائز اهمیت است. بیماری‌های ویروسی از جمله ویروس کوتولگی آلو Prune dwarf virus در برگ درختان آلوده علائمی نظیر موزاییک شدید، چین‌وچروک، لکه‌های نکروزی و همچنین لکه‌های قرمز در میوه‌های رسیده گیلاس گزارش شده است. همچنین بیماری‌های ویروسی دیگر مانند ویروس برگ قاشقی گیلاس Cerry leaf roll virus, ویروس آبله آلو Plum

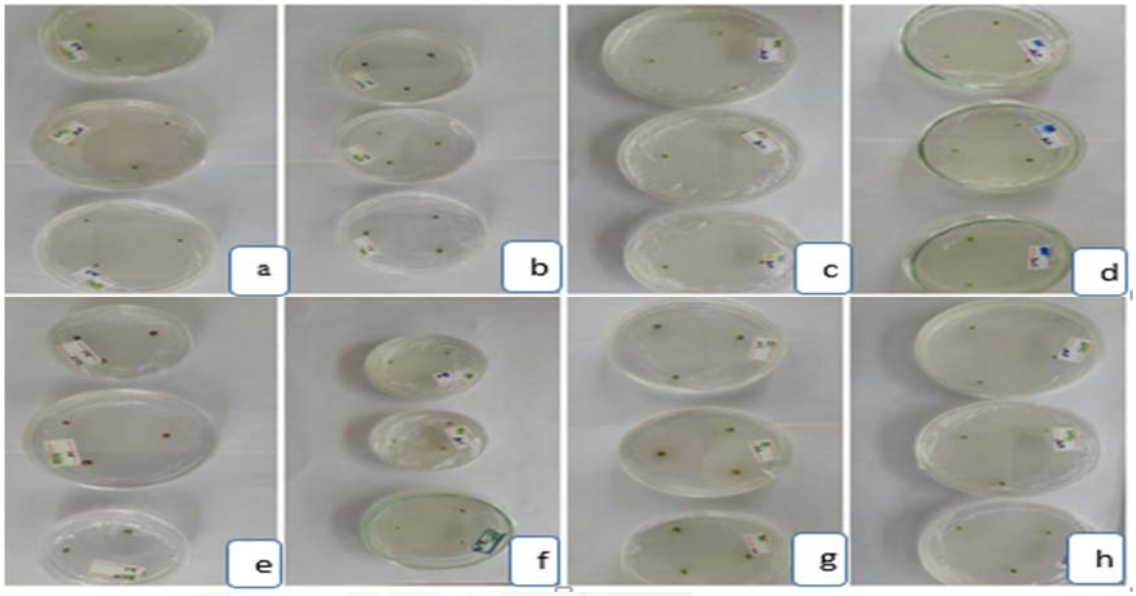
pox virusویروس لکه حلقوی لافت مرده‌ی هسته دارها Prunus necrotic ring spot virus از مهم‌ترین بیماری‌های گیلاس هستند که آلودگی این ویروس با کاهش جوانه‌زنی، کاهش رشد میوه، و تأخیر در رسیدن میوه، نکروز و کوتاه شدن طول برگ همراه است(Oliver *et al.*, 2009) .

طی تحقیقاتی در الجزایر گونه‌های پرونوس مورد آزمایش قرار گرفتند که گیلاس در میان سایر گونه‌های پرونوس بیشترین آلودگی را نشان داد. همان‌طور که ذکر شد این بیماری‌ها اثر زیادی در کاهش و تقلیل تولید میوه و رشد گیاه دارند (Retheesh *et al.*, 2010). ویروس‌های بیماری‌زا سالانه خسارت‌های زیادی به محصولات باغی از جمله گیلاس وارد می‌کنند، این در حالی است که کنترل بیماری‌های ویروسی پس از آلودگی باغات، معمولاً ناممکن است. بنابراین بهترین روش برای مبارزه با این عوامل تولید پایه‌های عاری از ویروس است به این منظور در بین روش‌های کشت بافت، کشت مریستم مورد توجه خاص محققان قرار گرفته است.استقرار مریستم در محیط کشت تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی مانند محیط پایه، تنظیم‌کننده‌های رشد و زمان نمونه‌گیری می‌باشد بنابراین پژوهش حاضر به‌منظور تعیین محیط کشت پایه بهینه برای استقرار و بررسی میزان نکروزه شدن گیلاس انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد نظر شاخه‌های گیلاس ژنوتیپ امیدبخش اشنوید، حاصل از برنامه‌های به نژادی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری از موسسه تحقیقات علوم باغبانی کرج تهیه شد. سپس برای سترون‌سازی جداکشت‌ها نوشاخه‌های جوان پس از برداشت و انتقال به آزمایشگاه با آب جاری شستشو داده و بعد از سترون‌سازی برای کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد. بدین منظور، بعد از جداکردن برگ‌ها و دمبرگ‌ها از شاخه، قطعات ۱/۵-۱ سانتی‌متری از نمونه‌ها تهیه شدند. جهت سترون‌سازی نمونه‌ها را با الکل ۷۰ ٪ و هیپوکلریت ۵۰ ٪ استریل کرده و در پایان ۳مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شده و برای کشت مورد استفاده قرار گرفت.

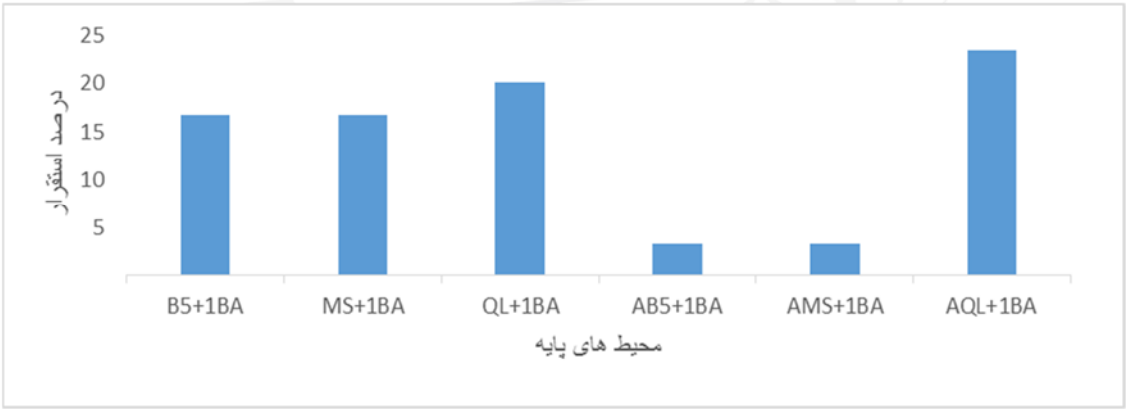
به‌منظور کشت ابتدا جوانه‌های جانبی و رأسی از قطعات جدا کشت ساقه سترون شده جدا کرده و سپس جوانه ها را در زیر استریومیکروسکوپ گذاشته، ناحیه مریستمی را تشخیص داده و مریستم‌ها را با اندازه ۰/۴-۰/۳ میلی‌متری جدا کرده و در محیط کشت‌های پایهQL (Quoirin and Lepoivre, 1977) و SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) و MS (Murashig and Skoog, 1962) و B_5 (Gamborg *et al.*, 1968) تهیه شده بدون آسکوربیک اسید و محیط کشت AB_5, ASH, AQL با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید و ترکیب هورمونی BA به میزان یک میلی‌گرم بر لیتر استقرار یافتند. در هر پتری دیش به‌طور متوسط ۳ ریزنمونه قرار گرفت، کشت‌ها در دمای۲ ±۲۵ در دوره‌ی نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. تقریباً بعد از ۳ هفته میزان زنده‌مانی و ظاهر فیزیولوژیکی برگ‌ها مورد بررسی قرار گرفت.



a) مریستم‌های ۱۰ روزه استقرار یافته در محیط b AMS) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط c AQL) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط MS d) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط e SH) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط f ASH) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط B_5 g) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط h QL) مریستم‌های ۱۰ روزه در محیط AB_5

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی‌ها ۳ هفته بعد از کشت نشان داد که اثر متقابل نوع محیط کشت و آسکوربیک اسید تأثیر معنی‌داری بر استقرار مریستم‌ها داشته است. یکی از مشکلات اساسی در کشت مریستم گیلاس نکروزه شدن آن است که در نتیجه با توقف رشد و از بین رفتن نمونه‌ها همراه است. نوع محیط کشت و ترکیبات اضافه شده به آن از فاکتورهای مهمی است که روی پاسخ نمونه‌ها به استقرار در محیط کشت اثر می‌گذارد. مقایسه حضور یا عدم حضور اسید آسکوربیک نشان داد که بیشترین درصد استقرار در حضور اسید آسکوربیک صورت گرفته که بیان‌گر تأثیر معنی‌دار اسید آسکوربیک بر استقرار مریستم‌هاست که با نتایج Dalal و همکاران (۲۰۰۴) هم‌خوانی دارد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. میانگین‌ها به روش دانکن مقایسه شدند و داده‌ها به کمک نرم‌افزار spss آنالیز شدند. رسم نمودار توسط نرم‌افزار Excel انجام شد.



نمودار ۱- میانگین درصد استقرار مریستم‌ها در محیط کشت‌های هورمونی

با استفاده از آسکوربیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان به‌طور قابل توجهی میزان نکروزه شدن و از بین رفتن نمونه‌ها در محیط کشت کاهش یافت (Strosse *et al.*, 2004). به‌منظور جلوگیری از قهوه‌ای شدن بافت ریز نمونه با استفاده از آسکوربیک اسید سم‌زدایی صورت گرفته و رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد (Titove *et al.*, 2006). همچنین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان از روند اکسیداسیون جلوگیری می‌کند. آسکوربیک اسید علاوه بر نقش آنتی‌اکسیدانی، در تقسیم سلولی و طویل شدن آن‌ها نقش دارد. اضافه کردن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید به محیط کشت MS به‌عنوان یکی از بهترین روش‌ها جهت کنترل نکروزه شدن جدا کشت‌های گلابی گزارش شده است (Poudyal *et al.*, 2008) همچنین مقایسه تأثیر آسکوربیک اسید نشان داد که بیشترین استقرار در محیط QL حاوی آسکوربیک اسید به میزان ۲۳,۳٪ صورت گرفته که با نتایج Vasar و همکاران در سال ۲۰۰۳ بروی گیلاس هم‌خوانی دارد که علاوه بر کاهش نکروزه شدن باعث افزایش شاخه‌زایی نیز می‌شود. بر اساس شرایط بهینه شده در این تحقیق محیط کشت QL با غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر آسکوربیک اسید می‌تواند بهترین محیط کشت برای استقرار مریستم‌های گیلاس بکار رود.

منابع

Dalal., M. A., Das, B., Rather, M. A and Bilal, S. 2004 Effect of media additives, incubation cul-ture conditions and subculturing on control of oxidative browning in in vitro culture of apple (*Malus domestica*). Indian Journal of Agricul-tural Sciences. 74(11): 600-603.

FAO. (2012). Cherry production. United Nations: Statistical Database-Agriculture, Food and Agricultural Organisation (FAO).

Hartmann HT, Kester DE, Davies FT. 1990. Plant Propagation, Principles and Practices. Prentice Hall International, New Jersey, USA, 145-189 P.

James,T., & Belanger, N. D. 1998. Perillyl alcohol: Application in oncology. Alternative Medicine Review, 3, 448–457.

Oliver, J.E.; Freer, J.; Andersen, R.L.; Cox, K.D.; Robinson, T.L.; Fuchs, M. 2009. Genetic diversity of Prunus necrotic ringspot virus isolates within a cherry orchard in New York. Plant Disease 93: 599-606.

Poudyal, B. K. DU, G. Zhang, Y. LIU, J. and Shi Q. (2008). Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe Fetel pears for in vitro culture. Front. Agric.China, 2(3): 321–330.

Retheessh, S.T. Bhat,A.I .2010. Simultaneous elimination of Cucumber mosaic virus and Cymbidium mosaic virus infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. Crop Protection, (29)1214-1217.

Strosse H, Van den Houwe I, Panis B (2004). Banana cell and tissueculture review, Science Publishers, Inc.

Titov, S. K. Bhowmik, A. Mandal, M. D. S. Alam and S. N. 2006. Uddin, "Control of Phenolic Compound Secretion and Effect of Growth Regulators for Organ Formation from Musa spp. cv. Kanthali Floral Bud Explants," Ame- rican Journal of Biochemistry and Biotechnology, Vol. 2, No. 3, pp. 97-104.

Traustadtir, T., Davies, S. S., Tian, S. P., Jiang, A. L., Xu, Y., & Wang, Y. S. (2004) Responses of physiology and quality of sweet cherry fruit to different atmosphere in storage. Food chemistry, 87, 43–49.

Vasar V (2003) Effect of ascorbic acid and citric acid on ex vitro rooting and acclimatization of Prunus avium L. microshoots. Acta Hortic. 23(4):171-175

The Effect of Ascorbic Acid and Basic Medium on the Establishment and Necrosis *Cerasus avium* (L.) Meristem

Parisa Jonoubi[1*], Naser Bouzari[2], Ahmad Majd[3], Maryam Maleki[4]
[1]Kharazmi University, Department of Biology, Tehran, Iran.
[2]Temperate and Cold Fruits Research Institute, Horticulture Science Institute, Karaj, Iran
[۳] Kharazmi University, Department of Biology, Tehran, Iran.
[۴]Master student of Kharazmi University of Department of Biology Karaj, Iran
*Corresponding Author: Maryam.maleki6996@yahoo.com

Abstract

The initial establishment of meristem one of the most important steps in the process of growing virus_free *in-vitro* plants is to produce .success in optimizing the culture medium in the stage, which guarantee the continued cultivation of proliferation. Since the establishment of meristem culture is influenced by various factors such as the basal medium, growth regulators and time sampling .The study aims at determining the optimal medium for the establishment and evaluation of cherry necrosis is done to this end, meristem from apical and lateral buds in four basal medium MS, QL, SH, B_5 with concentration 0 and 1 mg/L of ascorbic asid and BA (6-Benzyl Amino Purine) hormonal composition of 1 mg/L established. The results suggest that the meristem in a medium containing 1 mg/L ascorbic asid showed the highest percentage establishment.
Keywords: Meristem culture, Virus-free plant, Browning, Optimization, Cherry