اثر نوع محیط کشت و غلظت بنزیل‌آدنین بر باززایی و پرآوری شاخساره پایه پسته UCB1

سیداحمد حسینی*[۱]، متین جامی‌معینی[۲]

[۱*] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، شرکت کشت و صنعت جوین

[۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، سبزوار، ایران

*نویسنده مسئول: hoseini.eng0098@gmail.com

چکیده

به‌منظور بررسی اثر نوع محیط کشت و غلظت بنزیل آدنین بر باززایی و پرآوری شاخساره در پایه رویشی پسته UCB-1، دو آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار انجام شد. ابتدا اثر چهار محیط کشت WPM، DKW، OM و MS بر باززایی و پرآوری شاخساره مورد بررسی قرار گرفت. کلیه محیط‌های کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بودند. پس از انتخاب بهترین نوع محیط کشت، اثر غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد BA بر باززایی و پرآوری شاخساره ارزیابی گردید. محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت جامد OM حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بود. نتایج نشان داد که درصد باززایی شاخساره در کلیه محیط‌های کشت و غلظت‌های مورد استفاده BA مشابه و برابر با ۱۰۰ درصد بود. محیط‌های کشت OM و WPM بیشترین و محیط کشت MS کمترین تعداد شاخساره در ریزنمونه را دارا بودند. بیشترین طول شاخساره در محیط کشت OM بدست آمد و محیط‌های کشت DKW، WPM و MS به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. استفاده از محیط کشت WPM، باعث افزایش میزان تولید کالوس در مقایسه با سایر محیط‌های کشت گردید. با افزایش غلظت BA تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر، تعداد شاخساره در ریزنمونه و طول شاخساره‌ها افزایش یافت. افزایش غلظت BA به ۳ میلی‌گرم در لیتر، باعث کاهش معنی‌دار طول شاخساره در مقایسه با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر گردید. افزایش غلظت BA در محیط کشت، کیفیت شاخساره‌های تولیدی را کاهش داد. با توجه به نتایج، کاربرد ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA در محیط کشت OM، جهت باززایی و پرآوری مطلوب شاخساره در پایه پسته UCB1 قابل توصیه می‌باشد.

کلمات کلیدی: **پایه رویشی، سیتوکنین، طول شاخساره، کالوس.**

مقدمه

پسته (*Pistacia vera*) یکی از درختان خشکبار ناحیه مدیترانه است که از نظر تجاری مهم و در جهان با نام کشور ایران شناخته می‌شود. یکی از مهم‌ترین تصمیماتی که در احداث باغ پسته اتخاذ می‌شود، انتخاب پایه مناسب است. پایه‌ها معمولاً مستقیماً در باغ کاشته یا از نهال بذری پسته استفاده می‌شود. هر بذر پسته از نظر صفات ژنتیکی با بذر دیگر حتی اگر از یک درخت و یک خوشه هم باشند به علت دخالت گرده‌های نر گوناگونی که در تلقیح بذر شرکت داشته‌اند، متفاوت است. بنابراین پایه‌های بذری هیچ‌یک با پایه دیگر یکسان نیستند و آثارشان بر روی پیوندها متفاوت است (Mahammadi and Banihashemi, 2008).

پایه‌های مختلف تأثیر قابل‌توجهی بر میزان محصول پسته دارند، اما متأسفانه تاکنون در ایران توجه چندانی از طرف کشاورزان به پایه معطوف نشده است. پایه UCB-1 نتیجه تحقیقات و آزمایشات ارزشمند، طولانی و پرهزینه

دانشمندان آمریکا است و هم‌اکنون به‌عنوان بهترین و پرمحصول‌ترین پایه پسته موجود در دنیا شناخته می‌شود (Ferguson, 2008).

یکی از روش‌های کارآمد در تکثیر پایه‌های پسته و تولید پایه‌های یکسان، استفاده از تکثیر رویشی با کمک تکنیک‌های کشت بافت و ریزازدیادی پسته است. در این روش، به دلیل امکان بکارگیری آن در تمام فصول سال، دارا بودن سرعت و قدرت تولید تعدادی زیادی نهال در زمان و مکان کم با حفظ صفات پایه مادری به‌صورت کلون کردن مناسب‌ترین پایه‌ها و ارقام تجاری، می‌توان مواد گیاهی موردنیاز مناطق پسته‌کاری را تأمین نمود (Benmahioul *et al*., 2012).

تکثیر و ریشه‌زایی پسته در مقایسه با دیگر گونه‌های آجیلی، از همه مشکل‌تر است (Safari *et al*., 2013). محیط کشت یکی از اجزای بسیار مهم تکنیک‌های کشت سلولی و بافت گیاهی است و انتخاب محیط کشت یا تهیه فرمولاسیون آن برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. بیشتر گونه‌های گیاهی به محیط‌های کشت مختلفی نیاز دارند، ازاین‌رو انتخاب محیط کشت مناسب برای یک گونه با مشکلات فراوانی همراه است (Pierik, 1999).

در پژوهشی که در دانشگاه پکن بر روی کشت بافت قطعات ساقه و دانه پسته کرمان انجام شد، محیط کشت‌های DKW و 1/2DKW حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA همراه با ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA بهترین محیط کشت برای جوانه‌زنی بود. ضریب تکثیر در محیط DKW حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA حدود ۳/۶ گزارش شد (Fui *et al*., 2009).

استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط کشت، لازمه موفقیت تکنیک‌های مختلف کشت بافت می‌باشد. کینیتین، BAP، 2ip و BA از سیتوکنین‌هایی هستند که در شرایط کشت بافت استفاده‌ی متداول دارند. این هورمون‌ها، به‌ویژه اگر توأم با یک اکسین اضافه شوند، باعث تحریک تقسیم سلولی می‌شوند. سیتوکنین‌ها در غلظت‌های بالا باعث تشکیل ساقه‌ی نابجا می‌شوند، اما معمولاً از تشکیل ریشه ممانعت می‌کنند (Pierik, 1999).

در پژوهشی، بیشترین فراوانی در پرآوری شاخساره پسته، از ریزنمونه‌های گره‌ای کشت‌شده در محیط کشت متشکل از نمک‌های پایه MS و ویتامین‌های Gamborg حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر BA بدست آمد (Benmahioul *et al*., 2012).

با توجه به ارزش و اهمیت بالای پایه پسته UCB1 و همچنین نقش تکثیر رویشی و استفاده از تکنیک‌های کشت بافت در حفظ ویژگی‌های ژنتیکی نمونه‌های گیاهی، در پژوهش حاضر اثر نوع محیط کشت و غلظت تنظیم‌کننده رشد بنزیل آدنین بر باززایی و پرآوری شاخساره UCB1 در شرایط درون‌شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار و در دو مرحله انجام شد. در ابتدا اثر چهار نوع محیط کشت WPM[1]، DKW[2]، OM[3] و MS[4] بر باززایی و پرآوری شاخساره پایه رویشی UCB1 مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار اجرا گردید. کلیه محیط‌های کشت حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر IBA بودند.

پس از انتخاب بهترین نوع محیط کشت، در آزمایشی دیگر، اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده رشد BA (۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر) بر باززایی و پرآوری شاخساره ارزیابی گردید. محیط کشت مورد استفاده، محیط کشت جامد OM حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر تنظیم‌کننده رشد IBA بود. این آزمایش در قالب

[1]Woody Plant Medium
[2]Driver-Kuniyuki Walnut medium
[3] Olive Medium
[4] Murashige and Skoog

طرح کاملاً تصادفی با ۹ تکرار اجرا شد. در هر دو آزمایش، pH محیط‌های کشت برابر با ۵/۸ تنظیم شد و برای جامد کردن محیط کشت از آگار به میزان ۷ گرم در لیتر استفاده به عمل آمد.

پس از آماده‌سازی محیط‌های کشت، ساقه‌های نیمه‌خشبی از پایه‌های UCB1 پرورش یافته در گلخانه جدا شده و جهت تهیه ریزنمونه به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه ساقه‌ها به قلمه‌های تک‌گره برش خورده و به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از آب جاری شستشو شدند. ریزنمونه‌ها ابتدا به مدت ۴۰ ثانیه با الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱۲ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد ضدعفونی گردیدند. در نهایت ریزنمونه‌ها سه مرحله توسط آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ریزنمونه‌های استریل به ظروف کشت حاوی محیط‌های مختلف منتقل گردیدند. در هر ظرف کشت، ۵ عدد ریزنمونه بر سطح محیط کشت قرار گرفت. پس از پایان عمل انتقال ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌های کشت، ظروف کشت به اتاق رشد با شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۴۰۰۰ لوکس با فتوپریود ۱۶ ساعته منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز، کلیه ظروف کشت در رابطه با باززایی شاخساره و تولید کالوس مورد بررسی قرار گرفته و خصوصیاتی نظیر درصد باززایی شاخساره، تعداد شاخساره در ریزنمونه، طول شاخساره، تولید کالوس و کیفیت شاخساره‌های تولیدی ارزیابی گردید. به‌منظور تعیین کیفیت شاخساره، شاخساره‌ها بر اساس خصوصیات ظاهری (سبزینگی و شادابی) به سه گروه ضعیف (۱)، متوسط (۲) و عالی (۳) تقسیم‌بندی گردیدند.

عمل تجزیه واریانس داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS انجام شد و از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده به عمل آمد.

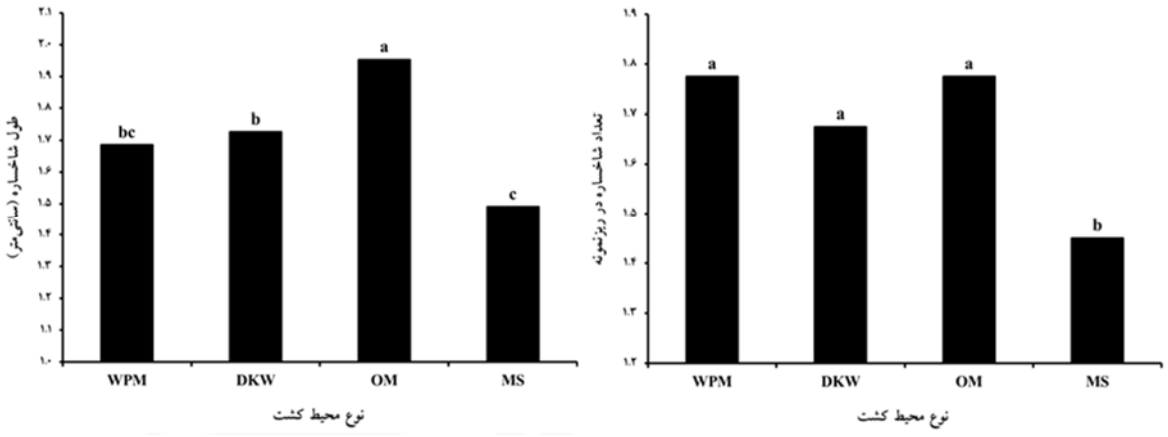
نتایج و بحث

با توجه به نتایج، نوع محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر تعداد شاخساره در ریزنمونه، طول شاخساره و تولید کالوس در ریزنمونه‌های ساقه داشت، اما درصد باززایی شاخساره و کیفیت شاخساره را تحت تأثیر قرار نداد. درصد باززایی شاخساره از ریزنمونه‌های نیمه‌خشبی ساقه پایه پسته UCB1، در کلیه محیط‌های کشت مشابه و برابر با ۱۰۰ درصد بود.

بر اساس نتایج مقایسات میانگین، محیط‌های کشت OM و WPM به‌طور مشترک بیشترین (۱/۷۸ عدد) و محیط کشت MS کمترین تعداد شاخساره در ریزنمونه (۱/۴۵ عدد) را دارا بودند. تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت DKW، WPM و OM در رابطه با تعداد ریزنمونه در شاخساره مشاهده نشد «شکل ۱».

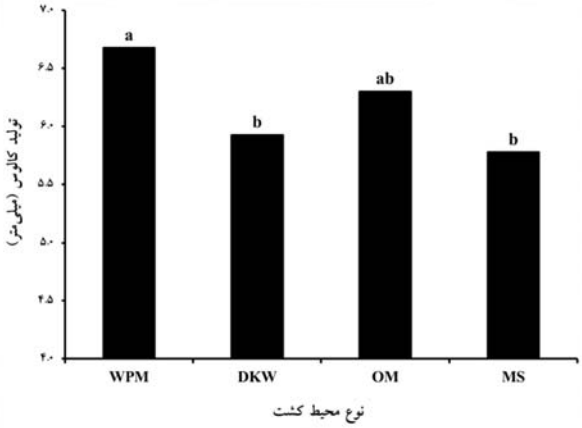
بیشترین طول شاخساره در محیط کشت OM بدست آمد که از اختلاف معنی‌داری با طول شاخساره در سایر محیط‌های کشت برخوردار بود. محیط‌های کشت DKW، WPM و MS به ترتیب در رتبه‌های بعدی از نظر طول شاخساره قرار داشتند. تفاوت معنی‌داری بین محیط‌های کشت DKW و WPM و همچنین محیط‌های کشت WPM و MS در رابطه با طول شاخساره وجود نداشت «شکل ۱».

محیط‌های کشت مختلف از نظر نوع و مقدار ترکیبات شیمیایی مورد استفاده برای تأمین عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف با یکدیگر متفاوت می‌باشند که این اختلافات می‌تواند منجر به واکنش متفاوت ریزنمونه‌های گیاهی گردد. در بین محیط‌های کشت مورد استفاده در کشت بافت گیاهی، محیط کشت MS دامنه گسترده‌تری داشته و برای گیاهان مختلف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. این در حالی است که محیط‌های کشت WPM، DKW و OM محیط‌های کشت اختصاصی هستند که بیشتر برای گیاهان چوبی و گیاهان دارای اندام‌های خشبی مورد استفاده قرار می‌گیرند.



شکل ۱: اثر نوع محیط کشت بر تعداد شاخساره در ریزنمونه (راست) و طول شاخساره (چپ)

در این آزمایش، استفاده از محیط کشت WPM، باعث افزایش میزان تولید کالوس در مقایسه با سایر محیط‌های کشت گردید. محیط کشت MS کمترین قطر کالوس در ریزنمونه‌ها را به خود اختصاص داد که از تفاوت معنی‌داری نسبت به محیط کشت DKW برخوردار نبود «شکل ۲».



شکل ۲: اثر نوع محیط کشت بر تولید کالوس در ریزنمونه‌های ساقه

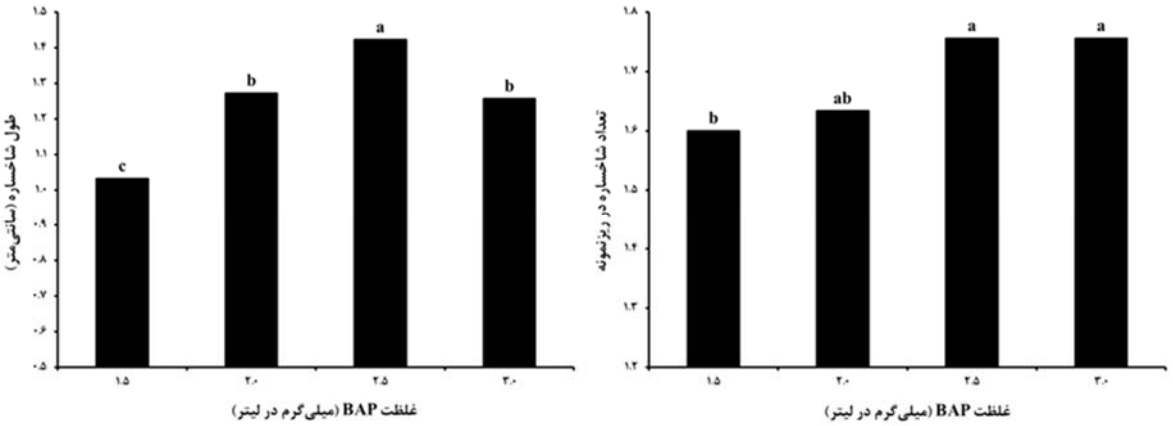
در بررسی ریزازدیادی پایه‌های مختلف درختان میوه از محیط‌های کشت متفاوتی استفاده شده است که انواع مختلف ناهنجاری‌های رشد به نحوی با نوع محیط کشت در ارتباط بودند. در بررسی تکثیر درون‌شیشه‌ای گزیلا ۵، محیط مناسب، محیط MS گزارش شد (Ruzic *et al.*, 2000).

غلظت تنظیم‌کننده رشد BA، درصد باززایی شاخساره را تحت تأثیر قرار نداد، اما تأثیر معنی‌داری بر تعداد شاخساره در ریزنمونه، طول شاخساره، کیفیت شاخساره و تولید کالوس در ریزنمونه‌های ساقه داشت. کلیه غلظت‌های مورد استفاده BA، منجر به ۱۰۰ درصد باززایی شاخساره در ریزنمونه‌های نیمه‌خشبی ساقه پایه پسته UCB1 گردید.

افزایش غلظت BA در محیط کشت، تعداد شاخساره در ریزنمونه را افزایش داد، به‌طوری‌که بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه (۱/۷۵ عدد) در غلظت ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA در رابطه با تعداد شاخساره وجود نداشت «شکل ۳».

افزایش تعداد شاخساره در ریزنمونه در واکنش به مصرف BAP، بیانگر نقش مشخص سیتوکنین‌ها در قابلیت تحریک، تکثیر و تقسیم سلولی در بافت‌های ریزنمونه مورد کشت و در نتیجه تشکیل اندام (اندام‌زایی) در بافت‌های تیمار شده می‌باشد. ریزنمونه گره دارای جوانه‌های نهفته و مستعدی است که مصرف سیتوکنین‌ها سبب تحریک تعداد بیشتری از آن‌ها شده و تعداد شاخساره در ریزنمونه را افزایش می‌دهد (Asghari, 2010).

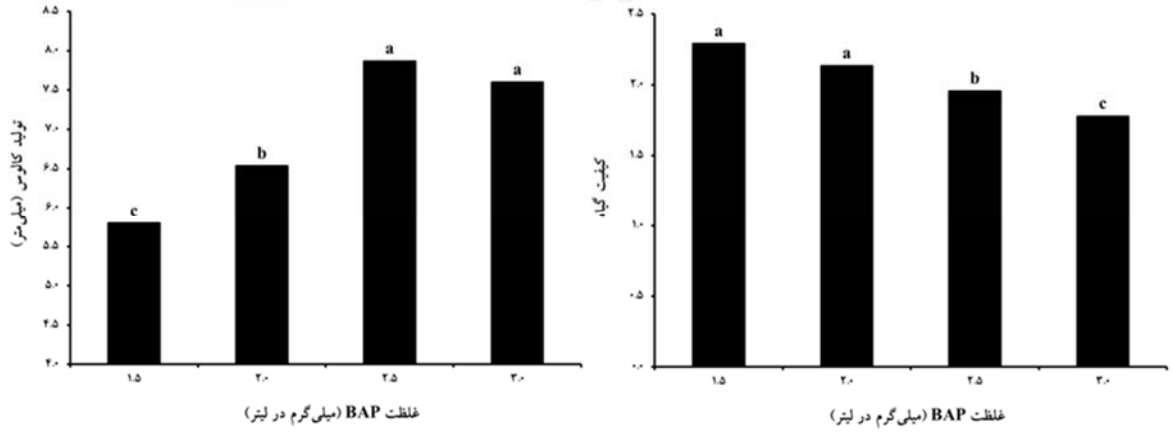
با افزایش غلظت BA تا ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر، طول شاخساره‌های پسته UCB1 افزایش یافت. افزایش غلظت BA به ۳ میلی‌گرم در لیتر، باعث کاهش معنی‌دار طول شاخساره در مقایسه با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر گردید. تفاوت بین غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA در رابطه با طول شاخساره معنی‌دار نبود «شکل ۳».



شکل ۳: اثر غلظت BA بر تعداد شاخساره در ریزنمونه (راست) و طول شاخساره (چپ)

افزایش غلظت BA در محیط کشت، کیفیت شاخساره‌های تولیدی را با توجه به معیارهای ظاهری مورد بررسی (سبزینگی و شادابی) کاهش داد. استفاده از غلظت‌های پایین BA به‌ویژه غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، باعث تولید شاخساره‌هایی با کیفیت عالی (شاداب و با سبزینگی بالا) گردید، درحالی‌که شاخساره‌های تولیدی با استفاده از غلظت‌های ۲/۵ و ۳ میلی‌گرم در لیتر BA، از کیفیت ظاهری پایین‌تری برخوردار بودند «شکل ۴».

استفاده از غلظت‌های بالای BA در محیط کشت، باعث افزایش میزان تولید کالوس در ریزنمونه‌ها گردید، به‌طوری‌که بیشترین قطر کالوس (۷/۸۶ میلی‌متر) در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر نداشت. غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نیز کمترین تولید کالوس را به خود اختصاص داد «شکل ۴».



شکل ۴: اثر غلظت BA بر کیفیت گیاه (راست) و تولید کالوس در ریزنمونه (چپ)

سیتوکینین به کارگرفته شده در محیط کشت در میزان باززایی و قدرت رشدی گیاه باززا شده بسیار مهم است و از اساسی‌ترین عوامل مؤثر بر میزان موفقیت در کشت بافت می‌باشد. سیتوکنین‌ها مواد افزاینده تقسیم سلولی محسوب می‌شوند که در غلظت‌های بالا باعث تشکیل ساقهٔ نابجا می‌شوند. آن‌ها از طریق کم کردن چیرگی انتهایی، باعث تحریک تشکیل ساقهٔ نابجا و عقب‌افتادگی پیری، می‌شوند (Farshadfar and Bakhshi Khaniki, 2012).

منابع

Asghari, F. 2010. Effect of ecotype, explants and plant hormonal compounds on regeneration of basil. Master of science thesis, University of Urmia. (in Persian).

Benmahioul, B., Dorion, N., Kaid-Harche, M. and Daguin, F. 2012. Micropropagation and ex vitro rooting of Pistachio (*Pistacia vera*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture; 108: 353-358.

Farshadfar, M. and Bakhshi Khaniki, Gh. 2012. Basics of plants biotechnology and tissue culture . Payame Noor University Press, Tehran. (in Persian).

Ferguson, L. 2008. Pistachio production manual, 5th edition. Fruit & Nut Research and Information Center.

Fui, Y., Yungfeng, D., Pingsheng, L., Qianlong, J., Dan, F. and Weixin, Y. 2009. Tissue Culture and Rapid ProPagation of Pistacia vera 'Kerman'. Chinese Agricultural Science Bulletin; 25: 42-40.

Mohammadi, A. H. and Banihashemi, Z. 2008. Effect of Different Levels of NaCl on Verticillium Wilt Disease of Pistachio in Hydroponic Culture. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources; 12(45): 239-248. (in Persian).

Pierik, R. L. M. 1999. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, pp 260.

Ruzic, D., Saric, M., Cerovic, R. and Culafic, L. 2000. Relationship between the concentration of macro elements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture; 63(1): 9-14.

The Effect of Different Culture Media and Benzyl Adenine Concentration on the Shoot Regeneration and Proliferation of Pistachio Cultivar UCB-1

Seyyed Ahmad Hosseini[1]*, Matin Jami Moeini[2]
[1*] M.Sc. student, Jovein Industrial and Agricultural Company
[2] Assistant professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Sabzevar Branch, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran
*Corresponding Author: hoseini.eng0098@gmail.com

Abstract

In order to evaluate the effect of different culture media and BA concentration on shoot regeneration and proliferation of pistachio cultivar UCB-1, two separate experiments based on completely randomized design were carried out at Biotechnology Laboratory of Islamic Azad University, Sabzevar Branch. At the first, the effect of WPM, DKW, OM and MS culture media on shoot regeneration and proliferation were investigated. All culture media were containing 30 g/l sucrose, 2 mg/l BA and 0.15 mg/l IBA. After selection of the best culture medium, effect of 1.5, 2, 2.5 and 3 mg/l BA concentrations on shoot regeneration and proliferation were evaluated. The OM medium containing 30 g/l sucrose and 0.15 mg/l IBA was used in this experiment. The results showed that shoot regeneration percentage was equal to 100% in all culture media and BA concentrations. The OM and WPM culture media had the highest number and MS medium had the lowest number of shoots per explant. The maximum shoot length was obtained at OM medium and DKW, WPM and MS culture media were ranked next, respectively. The use of WPM medium increased callus production compared to other culture media. Shoot number and shoot length were increased with increasing BA concentration up to 2.5 mg/l. Increasing BA concentration to 3 mg/l, significantly decreased shoot length compare with 2.5 mg/l BA concentration. Increasing BA concentration in culture medium decreased shoot quality. According to results, application of 2.5 mg/l BA at OM culture medium is recommended for favorable regeneration and proliferation of shoots in pistachio cultivar UCB-1.

***Keywords*: Callus, cytokinin, shoot length, vegetative rootstock.**