تعیین بهترین منبع کربوهیدرات در مرحله استقرار درون شیشه ای زیتون (*Olea ouropaea* L.)

سیده رقیه حسینی کردخیلی (۱)، حسین صادقی (۲)، سیدکمال کاظمی‌تبار (۳)، علی‌رضا طلایی (٤)

۱- کارشناس ارشد باغبانی دانشگاه آزاد علوم وتحقیقات تهران، ۲- استادیار گروه باغبانی دانشگاه کشاورزی ساری، ۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی ساری، ٤- استاد گروه باغبانی دانشگاه تهران.

زیتون با نام علمی *Olea ouropaea* L. درختی همیشه سبز با عمری طولانی از تیره *Oleaceae* می باشد. ریزازدیادی یک روش نسبتاً جدید برای ازدیاد زیتون است که هنوز جایگزین سیستم های متداول تکثیر نشده است و کاربرد آن در سطح وسیع نیاز به بهینه سازی دستورالعمل ها و سازگارنمودن آنها با نیازهای خاص ارقام مختلف زیتون دارد. با توجه به اهمیت کشت درختان زیتون، آزمایشاتی در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت بررسی تأثیر کربوهیدرات های مختلف بر کشت درون شیشه ای زیتون رقم رشید (*Olea ouropaea* cv. Rashid) انجام شد. به این منظور، جوانه های جانبی تک گره از درختان بالغ رقم رشید گرفته شد. ریزنمونه ها با هیپوکلریدسدیم ۱۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. پس از ضدعفونی سطحی، قطعات گره دار در محیط های کشت پایه شامل OM و MS تغییر یافته کامل شده با ۳ mg/l BAP و کربوهیدرات های ساکارز یا مانیتول با غلظت های ۳۰ g/l و۱۸ کشت شدند. نتایج نشان داد که هم نوع و هم غلظت کربوهیدرات پُرآوری شاخساره و سرعت رشد را تحت تأثیر قرار می دهد و سطوح مختلف ساکارز و مانیتول اثر معنی داری بر تعداد شاخساره و گره بوجود آمده از هر ریزنمونه دارند. بهترین نتایج استقرار در محیط‌های کشت دارای ۳۰ g/L مانیتول به‌دست آمد.

کلمات کلیدی: *Olea ouropaea* CV. *Rashid* ، کشت درون شیشه‌ای، مانیتول، ساکارز.

مقدمه:

زیتون با نام علمی *Olea ouropaea* L. درختی همیشه سبز از تیره *Oleaceae* می باشد. ریزازدیادی یک روش نسبتاً جدید برای ازدیاد زیتون است که هنوز جایگزین سیستم‌های متداول تکثیر نشده است و کاربرد آن در سطح وسیع نیاز به بهینه‌سازی دستورالعمل‌ها و سازگارنمودن آنها با نیازهای خاص ارقام مختلف زیتون دارد (۸). بررسی منابع در مورد کشت بافت زیتون در جهان نشان داد که در طول ۲ دهه اخیر تحقیقات وسیعی در این زمینه صورت گرفته و بیشینه این پژوهش‌ها مربوط به روجینی می‌باشد. کشت جوانه جانبی و پرآوری آن یکی از متداول‌ترین، سریعترین و کارآمدترین روش‌های ریزازدیادی در زیتون می‌باشد. گیاهان و بافت‌های کشت شده در شرایط درون‌شیشه‌ای در به طور کامل اتوتروف نبوده و نیاز به کاربرد خارجی کربوهیدرات‌ها به عنوان منبع کربنی می‌باشند. ساکارز کربوهیدرات انتخابی به عنوان منبع کربن برای کشت گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد (۳). در زیتون، مانیتول محصول اصلی فتوسنتز است که در برگ‌ها به غلظت بالائی می‌رسد. به همین دلیل، این پلی‌اُل می‌تواند منبع کربنی مناسبی برای کشت درون شیشه‌ای بافت‌های زیتون باشد (۵). در خصوص کشت درون شیشه‌ای ارقام زیتون ایرانی با استفاده از ریزنمونه‌های بر گرفته از بافت‌های بالغ در محیط‌های کشت حاوی انواع کربوهیدرات و غلظت‌های مختلف آن گزارش‌های منتشر شده معدودی وجود دارد (٤،۲،۱). لذا در تحقیق حاضر تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول در دو محیط کشت مختلف بر ریزازدیادی یک رقم زیتون بومی ایران با نام رشید (*Olea ouropaea* cv. *Rashid*) مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

در این تحقیق از درختان بالغ زیتون رقم رشید موجود در باغ کلکسیون ارقام زیتون در دانشکده کشاورزی ساری، به عنوان گیاهان مادری استفاده شد. قلمه‌هایی با ۳ تا ٤ گره حاصل از رشد شاخه‌های جدید در اوایل بهار از درختان مادری جمع‌آوری

و پس از انتقال به آزمایشگاه، برگ‌ها به گونه‌ای که جوانه‌های جانبی آسیب نبینند، جدا شدند. پس از پیش‌تیمار قلمه‌ها با بنومیل ۱٪ (۲۰ دقیقه) به زیر لامینارمنتقل شده و در الکل ۷۰٪ (۳۰ ثانیه) قرار گرفتند. سپس قلمه‌ها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱۵٪ (۱۵دقیقه) غوطه‌ور شده و در نهایت ۳ بار (۳ دقیقه) با آب سترون شستشوی شدند. جوانه‌های جانبیضد عفونی شده به صورت قطعات تک‌گره درون محیط‌های کشت پایه OM و MS تغییریافته (Leva and Fiorino, 1986) حاوی ۳ mg/l BAP با سطوح مختلف کربوهیدرات‌های ساکارز و مانیتول،g/l ۸ آگار با pH =۵/۷ کشت شدند(جدول ۱). تعداد شاخساره بوجود آمده از هر ریزنمونه، تعداد گره، ۵ هفته پس از تیمار بررسی شد. سپس ریزشاخه‌های بوجود آمده درون همان محیط‌ها ولی با ۳۰ گرم در لیتر ساکارز یا مانیتول واکشت شدند و به مدت ۸ هفته نگهداری شدند. ریزنمونه‌های کشت شده در اتاقک رشد (دما ۲٤±۲°c و شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی) به مدت ۵ تا ۸ هفته نگهداری شدند. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی، با ۱۰ تکرار هر تکرار شامل دو ریزنمونه انجام شد. بررسی اختلاف میانگین داده‌ها، با نرم افزار SPSS وگروه‌بندی نمونه‌ها براساس آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث:

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده در کشت اول و واکشت در سطح آماری ۱٪ معنی‌دار می‌باشند(جدول۲). با توجه به نتایج بدست آمده در کشت اول، بیشترین میانگین تعداد شاخساره(۱/۷۲۵) در تیمار محیط MS تغییر یافته دارای۳۰g/l مانیتول مشاهده شد. تیمار مربوط به محیط کشت OM حاوی ۱۸g/l کمترین تعداد شاخساره (۱/۰۷۵) را بوجود آورد. همچنین بیشترین میانگین تعداد گره(۲/۳۲۵) در محیط‌های کشت MS تغییر یافته با غلظتg/l ۳۰ مانیتول و کمترین میانگین تعداد گره (۱/۱۲۵) در محیط کشت OM دارای ساکارز(g/l ۱۸) مشاهده گردید(جدول۳).

جدول ۲: تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی در کشت اول و واکشت

منابع تغییرات	درجه‌آزادی		میانگین مربعات تعداد گره	میانگین مربعات تعداد شاخساره	آماره F تعداد گره	آماره F تعداد شاخساره
بین گروه‌ها (تیمار)	۷	کشت اول	۰/۵۲۳	۱/٤۲۱	۷/۷۹٦[**]	۱۲/۸۳۳[**]
		واکشت	۰/٤۲۵	۱/۰۳	۷/۵۰۱[**]	٦/۹۱٤[**]
درون گروه‌ها (خطا)	۷۲	کشت اول	۰/۰٦۷۱	۰/۱۱۱		
		واکشت	۰/۰٦۷۵	۰/۲٦٤		
کل	۷۹					

بهترین میانگین تعداد شاخساره(۱/٦۵) در واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه MS تغییر یافته دارای مانیتول۳۰g/l به همان محیط با مانیتول ۳۰g/l مشاهده شد در حالی‌که کمترین میانگین تعداد شاخساره (۱/۱۵) در واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه OM با ۱۸gr/l ساکارز به همان محیط با ساکارز ۳۰g/l مشاهده گردید. واکشت ریزنمونه‌ها در محیط‌های کشت OM و MS تغییریافته از g/l ۱۸ به g/l ۳۰ ساکارز نتایج خوبی نشان نداد. افزایش غلظت مانیتول از ۱۸g/l به ۳۰g/l سبب افزایش شاخه‌زایی و تعداد شاخه‌ها گردید در حالی‌که تغییر غلظت ساکارز از ۱۸g/l به g/l ۳۰ سبب کاهش شاخه‌زایی در هر دو محیط کشت گردید. بیشترین میانگین تعداد گره (۲/٦۲۵) در واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه MS تغییر یافته با مانیتولg/l ۳۰ به همان محیط با مانیتول ۳۰g/l و کمترین آن (۱/۱۵) در واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه OM با ۳۰g/l ساکارز به همان محیط با ساکارز ۳۰g/l مشاهده شد(جدول۳).

جدول ۳ گروهبندی میانگین تیمارها بر اساس آزمون دانکن در محیط کشت اولیه و واکشت

تیمار	محیط کشت اولیه		مرحله واکشت	
	میانگین تعداد شاخساره	میانگین تعدا گره	میانگین تعداد شاخساره	میانگین تعدا گره
T_1	۱/۹۲۵^{ab}	۱/۳۷۵^{bc}	۱/۵۷۵^{ab}	۲/٤۷۵^{ab}
T_2	۲/۳۲۵^{a}	۱/۷۲۵^{a}	۱/٦۵^{a}	۲/٦۲۵^{a}
T_3	۱/۷^{b}	۱/۱۲۵^{c}	۱/۲۵^{bc}	۱/۸۵^{bcd}
T_4	۲/۱۵^{a}	۱/۵۵^{ab}	۱/۲۵^{bc}	۲/۳۷۵^{abc}
T_5	۱/٦۵^{b}	۱/۳۵^{bc}	۱/٦۲۵^{a}	۱/۷۵^{cd}
T_6	۲/۰۷۵^{ab}	۱/٦^{ab}	۱/۵۲۵^{ab}	۲/۳۷۵^{ab}
T_7	۱/۱۲۵^{c}	۱/۰۷۵^{c}	۱/۱۵^{c}	۱/٦^{d}
T_8	۱/٦۵^{b}	۱/۲۷۵^{bc}	۱/۲۲۵^{bc}	۱/۱۵^{d}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسان هستند، در سطح P=%1 اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

بررسی‌ها نشان داد که هم نوع و هم غلظت کربوهیدرات پُرآوری شاخساره و سرعت رشد را تحت تأثیر قرار می دهد. محیط-های دارای ساکارز ۱۸ گرم در لیتر نسبت به محیط‌های دارای مانیتول با همان غلظت نتایج خوبی نشان ندادند. در مرحله اول تفاوت چندانی بین غلظت‌های مختلف مانیتول در شاخص‌های رشدی (تعداد شاخه، تعداد گره) مشاهده نشد. مانیتول در مقایسه با ساکارز، پُرآوری ساقه را افزایش داده و کیفیت عمومی و یکنواختی ساقه‌ها را بهتر می‌کند (٦). بیشترین تعداد گره در ریزقلمه‌های کشت شده در محیط دارای مانیتول نسبت به ریزنمونه‌های کشت شده در محیط دارای ساکارز بدست آمد (۷) درحالی‌که رقم روغنی در محیط دارای ساکارز از وضعیت رشد بهتری برخوردار بوده ولی تعداد شاخساره در محیط دارای مانیتول بیشتر مشاهده شد (٤). انتقال ریزقلمه‌ها از محیط کشت دارای ۱۸ گرم در لیتر ساکارز به محیط کشت ۳۰ گرم در لیتر ساکارز سبب نکروزه شدن برگ‌های موجود در اکثر ریزقلمه‌ها و متعاقب آن ریزش شد. در مقایسه دو کربوهیدرات، مانیتول اثر مثبتی در تولید تعداد گره‌ها نشان داد (٦). مانیتول محصول اصلی فتوسنتز در درختان زیتون است که به وسیله آوندهای آبکش انتقال می‌یابد. مانیتول در بافت‌های ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای به غلظت‌های بالایی می‌رسد که برای کربوهیدرات‌های دیگر سوخت‌وساز می‌شود (۷). هنوز مشخص نشده است که چرا مانیتول رشد ریزنمونه‌های درون شیشه ای را بیشتر از ساکارز افزایش می‌دهد (۳)، شاید به دلیل این‌که مانیتول مانند تنظیم کننده‌های رشد عمل کرده و غالبیت انتهایی و تولید کالوس را کاهش می‌دهد (۵).

منابع:

۱- تابش، فرزانه. ۱۳۸۳. ریزازدیادی زیتون با کشت ریزقلمه، پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

۲- خسرو شاهلی، محمود. ۱۳۸۱. تولید شاخساره در زیتون رقم دزفولی در کشت درون‌شیشه‌ای، مجله دانش کشاورزی، ج۱۲، ش۳.

3-Garcia, J.L., J. Troncoso,. R, Sarmiento and A, Troncoso. 2002. Influence of carbon source and concentration on the in vitro development of olive zygotic embryos and explants raised from them. Plant Cell Tissue Org. Cult. 69, 95–100.

4-Farahani. F., M. Peyvandi and M. Hosseini Mazinani. 2004. Effect of Sucrose and Mannitol on in vitro regeneration of *Olea europaea* L. (cv. Rowghani). Abstract book"5th International Symposium on Olive Growing. Izmir (Turkie). 27 September-2 October. P.PN-229.
5-Leva A.R., R.Petruccelli and L.Polsinelli. 2004. In vitro prppagation: From the Loboratory to the production line. OLIVE. No. 101. pp 18-26.
6-Leva A.R., R.Petruccelli., G.Bartolini. 1994. Mannitol "in vitro" culture of Olea eropaea L. (cv. Maurino). Acta. Hort. 336: 43-46
7-Leva A.R., R. Mulco and R. Petruccelli. 1995 . Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons.Hortic. Sci. 70: 417-421.
8-Zuccherelli, G., Zuccherelli, S. 2002. In vitro propagation of 50 olive cultivars. Acta Hort. 586, 931–934.