شفاهی

مقایسه روش‌های ضد عفونی سطحی و محیط های کشت مناسب برای استقرار درون شیشه‌ای فندق

مهین آفتابی (۱)، جواد مظفری (۲)، سونا حسین آوا (۳)، سید محمد میری (٤)

۱- کارشناس مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ۲و۳- عضو هئیت علمی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر،٤- عضو هئیت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

جوانه های درختان بالغ فندق از کولتیوارهای پاییزه، پشمینه و گردویی پس از ضدعفونی با سه روش ۱- کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به مدت ۷ دقیقه ۲- کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به مدت ٤ دقیقه + ۱/٦ ٪ سفید کننده تجارتی (۵ ٪ کلر فعال) به مدت ۲۰ دقیقه ۳ – ۲/۵ ٪ سفید کننده تجارتی (۵ ٪ کلر فعال) به مدت ۱۵ دقیقه در ۵ محیط کشت پایه شامل PT، MOLT، DKW، WPMو MS/2 کشت گردیدند. ضد عفونی با ۲/۵٪ سفید کننده تجارتی (۵ ٪ کلر فعال) به مدت ۱۵ دقیقه با تولید ۰/٤٦٪ ± ۹٤/۲۸ ریز نمونه های غیر آلوده و سالم به عنوان روش ضد عفونی مناسب و محیط کشت MOLT با ترکیب هورمونی (بنزیل آدنین ۱/۵میلی گرم در لیتر, جیبرلیک اسید ۰/۱ میلی گرم در لیتر و ایندول تری بوتیریک اسید۰/۰٤ میلی گرم در لیتر) که تعداد برگ، طول شاخساره و کیفیت رشد بالایی را در ژنوتیپ های پاییزه و پشمینه تولید نمود به عنوان محیط کشت مناسب برای رشد ریز نمونه های هر دو ژنوتیپ و محیط کشت PT با ترکیب هورمونی (بنزیل آدنین ۰/۵ میلی گرم در لیتر, جیبرلیک اسید ۰/۱ میلی گرم در لیتر و ایندول تری بوتیریک اسید ۰/۰٤ میلی گرم در لیتر) به عنوان محیط کشت مناسب برای رشد ریز نمو نه های ژنوتیپ گردویی تشخیص داده شد.

مقدمه:

فندق یکی از میوه های مهم خشکباری است و از نظر دارویی و ارزش غذایی جایگاه قابل توجهی دارد . کشور ایران از نظر تولید فندق در دنیا مقام ششم را دارد (حسین آوا، ۱۳۸۳). گیاه فندق استفاده های زیادی دارد و به دو صورت با پوست و بدون پوست به فروش می رسد و میوه های آنها به طور وسیع در شیرینی سازی و مواد آرایشی به کار می رود (Rodr′iguez et al.,1989) . از چوب فندق در مبل سازی و دکوراسیون و از پوستهٔ سخت آن در ایجاد حرارت در گلخانه ها استفاده می شود (حسین آوا ، ۱۳۸۳) . تکنیک تکثیر درون شیشه ای تولید کلونی گیاهان یکنواخت را میسر می سازد و در سطح وسیع برای گونه های چوبی استفاده می شود زیرا اولا"روش تکثیر غیرجنسی مطمئنی را فراهم می سازد ثانیا" انتشار سریع ژنوتیپهای جدیدبا خصوصیت های زراعی با کیفیت بالا را فراهم می کند.

هدف از این تحقیق **بهینه کردن محیط کشت برای ارقام تجاری و ژنوتیپ های موجود در ایران ، تولید گیاهان یکنواخت در زمان کم نسبت به روشهای سنتی و با صرفه اقتصادی ، سهولت تبادل مواد ژنتیکی به صورت گیاه کامل در اندازه و حجم کم و** تسریع عرضه به باغداران می باشد.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی و انتخاب ریز نمونه:

ارقام فندق جمع آوری شده در کلکسیون باغ کما ل آباد کرج به اسامی تابستانه ، اصل قره باغ ، رسمی ، گردویی ، پاییزه ، **پشمینه ، خندان ، تیپ گرد اشکورات ، شصتک ۱ ، ناخن رود ، گرچه ، محلی کرج** ، انبوه ، میش **پستان** و شیروانی به صورت درون شیشه کشت شدند و سپس رقم های پاییزه ، پشمینه و گردویی که **دارای** کیفیت مغز خوب ، عملکرد بالا نسبت به بقیه ارقام ودارای قدرت رشد بالا بودند جهت بهینه سازی محیط کشت برای ریز ازدیادی انتخاب شدند. در فصل بهار اواخر اردیبهشت ماه از پاجوش های این ارقام نمو نه های علفی انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند.

مراحل آماده کردن ریز نمو نه ها جهت انجام ضدعفونی :

۱- شستشو با آب شیر وسپس حذف برگها و گوشواره ها

۲- شستشو با آب صابون به مدت ۱۰ دقیقه و سپس آبکشی با آب شیر

۲- بریدن شاخه ها به قطعات حاوی یک جوانه به طول ۱/۵-۱ سانتی متر

٤- قراردادن جوانه ها زیر آب جاری به مدت حداقل یک ساعت تا ٢٤ ساعت جهت محدود کردن قهوه ای شدن کشت((Compton *et al*.,1986

ضد عفونی ریز نمونه ها :

۱- ریز نمو نه ها پس از تهیه در الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه قرار داده شدند و سپس با آب مقطر استریل شستشو گردیدند.

۲- ریز نمونه ها در هر روش در مواد ضد عفونی کننده به مدت لازم قرار داده شدند و در زمان ضد عفونی جهت تماس بیشتر سطح ریز نمو نه ها با مواد ضد عفونی کننده به روش شیکر تکان داده شدند.

۳- سپس سه بار آبکشی با آب مقطر استریل هر باربه مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

٤- بعدا" ریز نمونه ها در پتری دیش های حاوی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند.

۵- برش انتهای ریز نمو نه ها جهت حذف قسمت سفید شده در اثر ضد عفونی انجام گرفت.

٦- خشک کردن ر یز نمو نه ها به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه انجام شد.

۷- سپس ریز نمو نه ها در محیط های کشت قرار گرفتند.

تیمارهای استریل به شرح ذیل بودند:

۱- کلرید جیوه ۰/۱ ٪ بعلاوه ٤ قطره توییین ۲۰ به مدت ۷ دقیقه

۲- کلرید جیوه ۰/۱ ٪ بعلاوه ٤ قطره توییین ۲۰ به مدت ٤ دقیقه + ۱/٦ ٪ سفید کنندۀ تجارتی(۵ ٪ کلر فعال) و ٤ قطره توییین ۲۰ به مدت ۲۰ دقیقه

۳-۲/۵ ٪ سفید کنندهء تجارتی (۵ ٪ کلر فعال) بعلاوه ٤ قطره توییین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه

محیط کشت های مورد استفاده :

DKW (Driver and Kuniyuki 1984)
WPM (Lloyd and McCown,1980)
PT (macro and micro Perez-Torner et ., 2000 and DKW organics)
MS/2 (Murashige and Skoog, 1962; $^{1}/_{2}$ macro,$^{1}/_{2}$ micro)
MOLT(combination of DKW and WPM)

جدول ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت (غلظت به میلی گرم در لیتر)

اجزا	DKW	WPM	MOLT	PT	MS
Microelements					
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۲۵
FeNaEDTA	٤٤/٦٣	٣٦/٨٠	٤٤/٦٣	٣٦/٧٠	–*
$FeSO_4.7H_2o$	–	–	–	–	٢٧/٨
Na_2EDTA	–	–	–	–	٣٧/٣
H_3BO_3	٤/٨	٦/٢٠	٦/٢٠	٦/٢٠	٦/٢
$MnSO_4.H_2O$	٣٣/٨٠	٢٢/٣٠	٣٣/٨٠	٢٢/٣٠	١٦/٩٠
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/٣٩	۰/۲۵	۰/٣٩	۰/۲۵	۰/۲۵
$ZnSO_4.7H_2O$	١٧	٨/٦٠	١٧	٨/٦٠	٨/٦
KI	–	–	–	–	۰/٨٣
$COCl_2.6H_2O$	–	–	–	–	۰/۰۲۵
Macroelements					
CaCl2	١١٢/٥	٧٢/٥	١١٢/٥	٧٢/٥	–
CaCl2.2H2O	–	–	–	–	٤٤٠
Ca(NO3)2.2H2O	١٦٦٤/٦٤	٤٧١/٢٦	١٦٦٤/٦٤	٤٧١/٢٦	–
KH2PO4	٢٦٥	١٧٠	٢٦٥	١٧٠	١٧٠
K2SO4	١٥٥٩	٩٩٠	١٥٥٩	٩٩٠	–*
KNO3	–	–	–	–	١٩٠٠
MgSO4	٣٦١/٤٩	١٨٠/٥٤	٣٦١/٤٩	١٨٠/٥٤	–
MgSO4.7H2O	–	–	–	–	٣٧٠
NH4NO3	١٦١٤	٤٠٠	١٦١٤	٤٠٠	١٦٥٠
Vitamins					
Glycine	٢	٢	٢	٢	٢
Myo-Inositol	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
Nicotinic acid	١	۰/٥٠	١	١	۰/٥
Pyridoxine Hcl	–	۰/٥٠	۰/٥	–	۰/٥
Thiamine Hcl	٢	١	٢	٢	۰/١

بعد از ضد عفونی، ر یز نمو نه ها به محیط های کشت که دارای ۰/۰٤ میلی گرم در لیتر(IBA) ، ۰/۱ میلی گرم در لیتر (GA_3) و ۰/۵ میلی گرم در لیتر (BA) برای محیط کشت PT و ۱/۵ میلی گرم (BA) برای محیط کشتهای DKW, MS/2 , WPM , MOLT بودند منتقل شدند .کشت ها به جهت کم شدن اکسیداسیون فنلی ٢٤ ساعت در تاریکی (Druart *et al.*,1982) قرار گرفتند سپس به اتاق رشد با دمای ۱ ± ۲۳ درجهٔ سانتی گراد با دورهٔ نوری ١٦ ساعت ، تحت

نور سفید لامپ مهتابی با شدت نور ۳۷/۵ میکرومول در ثانیه در متر مربع منتقل شدند(Damiano *et al* ., 2005). .بعد از ۱۰ روز یادداشت برداری از آلوده ها و بعد از ۳۵ روز یادداشت برداری از طول شاخساره ، تعداد برگ ، تعداد شاخساره و ظاهر گیاهچه ها انجام گرفت . آزمایشات به صورت فاکتوریل ، در قالب طرح کاملا" تصادفی ، در سه تکرار و هر تکرار دارای ۵ ریز نمو نه اجرا شد . تجزیه آماری در نرم افزار SPSS و. مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفت (P =۰/۰۵).

نتایج و بحث:

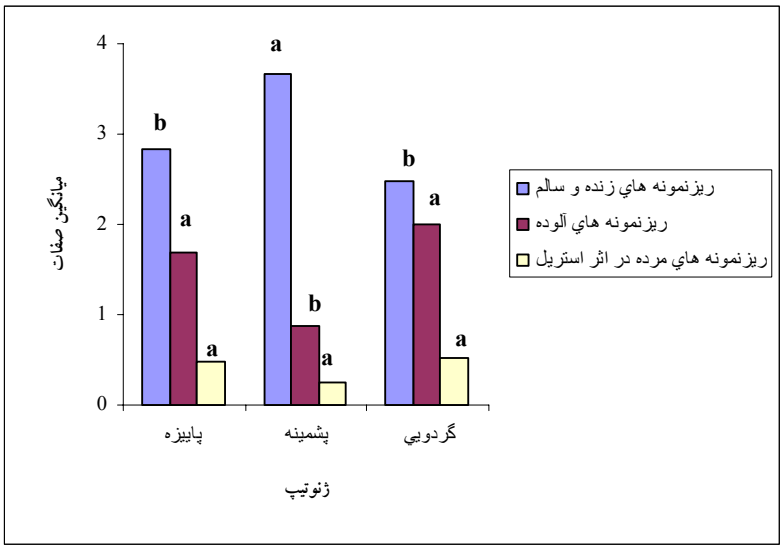
تعیین مناسب ترین روش ضد عفونی سطحی نمونها:

در تعیین مناسبترین روش ضد عفونی سطحی نمو نه ها ، تعداد ریز نمو نه های سالم، ریز نمو نه های آلوده و ریز نمو نه های مرده در اثر استریل برای تیمارهای ضدعفونی یادداشت برداری و به صورت جدول زیر منعکس گردید.

جدول(٤-١.-١) نتایج تیمارهای ضدعفونی

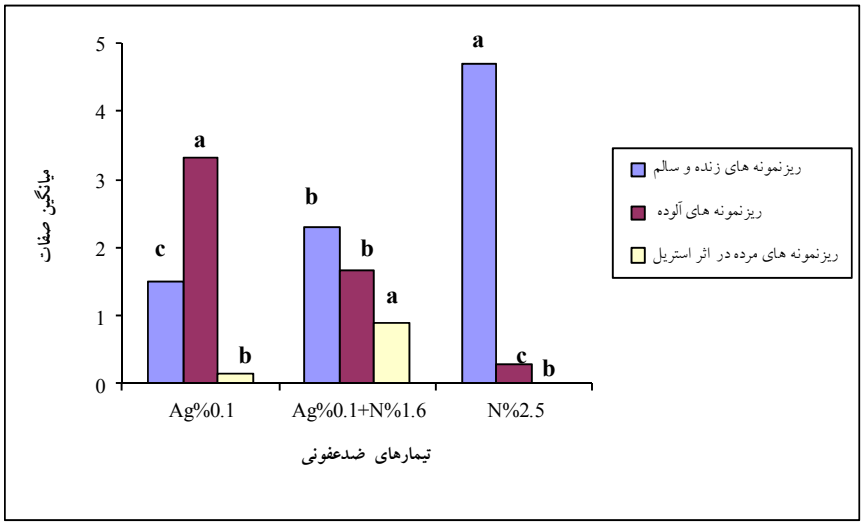
تیمار ضدعفونی	ژنوتیپ	تعداد نمونه کشت شده	پاسخ به ضد عفونی سطحی(٪)			
			زنده و غیرآلوده	مرده	آلودگی قارچی	آلودگی باکتریایی
کلرید جیوه ۰/۱٪به مدت ۷دقیقه	پاییزه	۲۰	٤٥	۰	٤٥	۱۰
	پشمینه	۲۰	۲۵	۵	٤٥	۲۵
	گردویی	۲۰	۲۰	۵	۵۵	۲۰
کلرید جیوه۰/۱ ٪ به مدت۳ ٤ ٤ دقیقه +۱/٦ ٪ سفیدکننده تجارتی به مدت ۲۰دقیقه	پاییزه	٤۰	۳۵	۰	۳۵	۷/۵
	پشمینه	٤٤	۷۹/۵٤	۱۱/۳٦	٦/۸۱	۲/۲۷
	گردویی	٤۰	۲۲/۵	۲۲/۵	٤۷/۵	۷/۵
۲/۵ ٪ سفید کننده تجارتی به مدت۱۵ دقیقه	پاییزه	۳۵	۸۸/۵۷	۰	۱/٤۳	۰
	پشمینه	۳۵	۹۷/۱٤	۰	۲/۸٦	۰
	گردویی	۳۵	۹۷/۱٤	۰	۰	۲/۸٦

تجزیه آماری نشان داد که بین ژنوتیپ ها ، تیمارهای ضد عفونی و اثرات متقابل آنها در سطح ١٪ تفاوت معنی داری وجود دارد(جدول٤-١-١).



شکل(٤-١-١) پاسخ ژنوتیپ ها به تیمارهای ضدعفونی

ژنوتیپ پشمینه دارای بیشترین تعداد ریز نمونه های زنده و سالم بود و ژنوتیپ های پاییزه و گردویی از نظر تعداد ریز نمو نه های زنده و سالم در یک کلاس قرار گرفته اند. .



شکل (٤-١- ٢)پاسخ تیمارهای استریل

٢/٥ ٪ وایتکس تجارتی(٥ ٪ کلر فعال) دارای بیشترین تعداد ریز نمونه های زنده و سالم و بدون ریز نمو نه های مرد ه بود.

جدول(٤-١-١) تجزیه واریانس تیمارهای ضد عفونی

میانگین مربعات تعداد ریزنمونه‌های مرده در اثراستریل	میانگین مربعات تعداد ریزنمونه های آلوده	میانگین مربعات تعداد ریزنمونه های سالم	df	منبع تغییرات
۰/۲۱ ns	۳/٦٤**	٤/۲۰**	۲	ژنوتیپ
۵/۱۹**	۳٦/۲۰**	۵۱/۷۹**	۲	تیمارهای ضدعفونی
۰/٤۲ns	٤/۵۱**	۵/٦۸**	٤	ژنوتیپ×تیمارهای ضدعفونی
۰/۰۷۱	۰/٦۵	۰/۷۱	٤۹	اشتباه آزمایشی

در صد ریز نمو نه های زنده و سالم در تیمارهای استریل:

تیمارکلرید جیوه ۰/۱ ٪ به مدت ۷ دقیقه ۷۹/٪۰±۳۰

تیمار١/٦ ٪وایتکس تجارتی (۵ ٪کلر فعال) به مدت ۲۰ دقیقه+کلرید جیوه ۰/۱ ٪ به مدت ۳دقیقه ۱/٦۰٪ ± ٤٦/۷۷

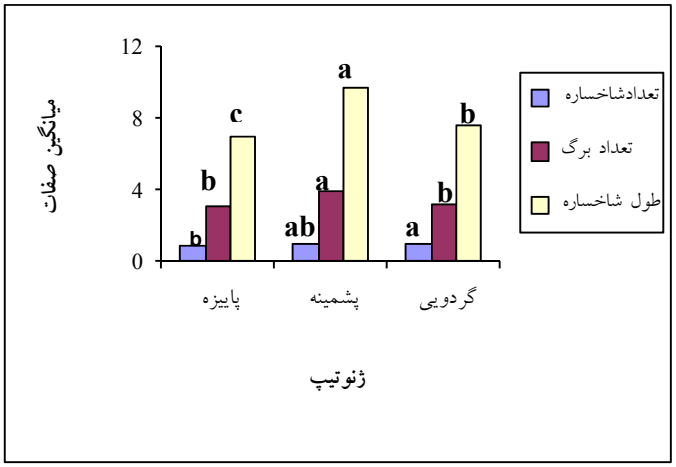
تیمار۵ /۲ ٪ وایتکس تجارتی(۵٪ کلر فعال) به مدت ۱۵ دقیقه ۰/٤٦٪ ± ۹٤/۲۸

بنابر این ضد عفونی با ۲/۵ ٪ سفید کننده تجارتی حاوی ۵ ٪ کلرفعال به مدت۱۵ دقیقه بیشترین درصد ریز نمو نه های زنده و سالم را ایجاد کرده و به عنوان مناسبترین تیمار ضد عفونی معرفی شد..

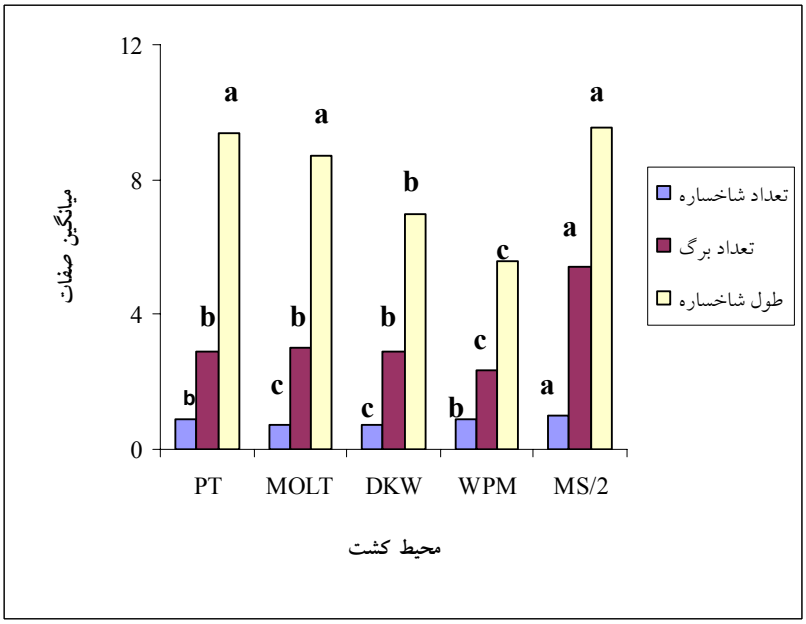
تعیین محیط کشت مناسب برای رشد درون شیشه‌ای فندق :

بعد از استقرار ریز نمو نه ها در محیط های کشت مختلف ، ۳۵ روز بعد از کشت ، یادداشت برداری از تعداد برگ ، طول شاخساره ، تعداد شاخساره و ظاهر گیاهچه ها در محیط های کشت مختلف انجام گرفت .

براساس نتایج به دست امده در صفات مورد بررسی بین ژنوتیپ ها ، محیط های کشت و اثرات متقابل آنها در سطح ۱٪ اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ٤-۲-۱).



شکل (٤-۲-۱)پاسخ ژنوتیپ ها به صفات مورد بررسی



شکل (٤-۲-۲)پاسخ محیط کشت ها به صفات مورد بررسی

با توجه به شکل بالا محیط کشت MS/2 از نظر تعداد شاخساره ، طول شاخساره و تعداد برگ در کلاس بالا قرار گرفته است ولی بر اساس یادداشت برداری ها MS/2 دارای برگ های ریز و سبز کمرنگ بود که ریزبودن برگها با گزارش Damiano و همکارانش (۲۰۰۵) مطابقت دارد و زردی برگ ها در محیط کشت MS توسط Nas و همکارش(۲۰۰۱) مشاهده شده و اظهار داشته که وقتی ریز نمونه های زرد در محیط کشت MS در طی چندین واکشت کشت شدند تعداد ریز نمونه های زنده به طور ناجور کاهش یافت.

جدول(٤-۲-۲) مقایسه میانگین تیمارها

ژنوتیپ / محیط کشت	پاییزه			پشمینه			گردویی		
	تعداد شاخساره	تعداد برگ	طول شاخساره	تعداد شاخساره	تعداد برگ	طول شاخساره	تعداد شاخساره	تعداد برگ	طول شاخساره
PT	۰/۸۷ab	۲/۲۰de	۷ fgh	۰/۸۷ ab	۳/٤۷c	۱۰/٤۰abc	۰/۸۷ ab	۳/۰۷ cd	۱۰/٦۷ab
MOLT	۰/ ٦۰ de	۳/۲۷ c	۹/۰۷ cde	۰/۸۰ bcd	۳/٥۳ c	۱۱/٥۳ a	۰/۸۰ bcd	۲/۲۰ de	٥/٤۷ ij
DKW	۰/۷۰cde	۳/۰۷cd	٦/۲۰ hi	۰/٥۰ e	۲/۰۷ e	٦/٦۷ ghi	۱ ab	۳/٦۰ c	۸ efg
WPM	۰/۹۳ ab	۲ e	٤/٤۰ jk	۱/۱۰ a	۳/۳۰ c	۸/۳۷ def	۰/۷۳cde	۱/۷۳ e	۳/۹۳ k
MS/2	۰/۹۰ab	٤/ ٦۷b	۷/٦۰ fg	۱/۱۰ a	٦/۷۰ a	۱۱/٤۰ a	۱/۱۰ a	٤/۹۰ b	۹/٦۷bcd

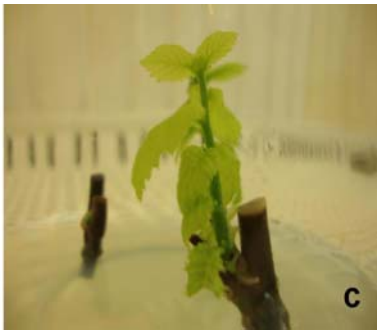
با توجه به این که تعداد شاخساره و تعداد برگ نرخ تکثیر ، طول شاخساره فاکتور رشد و رنگ و متناسب بودن اندازه برگها کیفیت رشد می باشد بر این اساس محیط کشت مناسب برای هر ژنوتیپ بر اساس جدول مقایسه میانکین تیمارها (٤-۲-۲)معرفی می گردد.

بر اساس جدول مقایسه میانگین ها در ژنوتیپ پاییزه محیط کشت PT ، WPM و MS/2 از نظر تعداد شاخساره در کلاس بالا قرار دارند .تعداد برگ در MS/2 در کلاس بالا ست.طول شاخساره در محیط کشت MOLT در کلاس بالا قرار دارد ولی طول شاخساره در MS/2. کمتر از MOLT می باشد در عین حال MOLT از نظر تعداد برگ یعنی نرخ تکثیر در کلاس بعد از MS/2 قرار دارد .بنا بر این محیط کشت MOLT که از حیث تعداد برگ یعنی نرخ تکثیر و طول شاخساره یعنی فاکتور رشد در کلاس بالا قرار دارد به عنوان **محیط کشت مناسب برای رشد درون شیشه ای**ژنوتیپ پاییزه پسشنهاد شد .

a= محیط کشت MS/2 و رشد ژنوتیپ پاییزه در این محیط

b= محیط کشت MOLT (محیط کشت منتخب برای ژنوتیپ پاییزه)

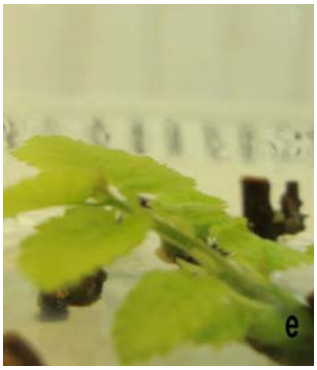
در ژنوتیپ پشمینه محیط کشت WPM و MS/2 درتعداد شاخساره در کلاس بالا قرار دارند.تعداد برگ در MS/2 در کلاس بالاست .طول شاخساره در MOLT و MS/2 در کلاس بالا قرار گرفته است ولی چون برگها در محیط کشت MS/2 ریز و سبز کمرنگ بودند و ریز بودن برگ ها و سبز کمرنگ بودن آنها کیفیت پایین رشد را می رساند بنابر این محیط کشت MOLT که از حیث تعداد برگ یعنی نرخ تکثیر بعد از MS/2 قرار گرفته و از حیث فاکتور رشد در کلاس بالاست به عنوان محیط کشت مناسب **برای رشد درون شیشه ای**ژنوتیپ پشمینه معرفی می گردد.



c = ریز بودن و کمرنگ بودن رنگ برگ ها ی ژنوتیپ پشمینه در محیط کشت MS/2

d = محیط کشت MOLT محیط کشت انتخابی برای ژنوتیپ پشمینه

درژنوتیپ گردویی تعداد شاخساره و تعداد برگ در محیط کشت MS/2 در کلاس بالا قرار دارد طول شاخساره که فاکتور رشد است در محیط کشت PT در کلاس بالا قرار گرفته است بنابراین با توجه به این که محیط کشت PT از نظر تعداد شاخساره یعنی نرخ تکثیر درکلاس بعد از MS/2 .قرار گرفته است به عنوان محیط کشت مناسب **برای رشد درون شیشه ای**ژنوتیپ گردویی معرفی می گردد.



e = محیط کشت MS/2

f = محیط کشتPT محیط کشت انتخابی برای ژنوتیپ گردویی

جدول تجزیه واریانس (٤-٢-١) **تعیین محیط کشت مناسب برای رشد درون شیشه‌ای فندق**

منبع تغییرات	df	میانگین مربعات تعداد برگ	میانگین مربعات طول شاخساره	میانگین مربعات تعداد شاخساره
ژنوتیپ	۲	۲/۷۷۱ **	۳۲/۳۹ **	۰/۰٤۰ *
محیط کشت	٤	۱۳/۰۸۹**	۲٦/٤۱۷ **	۰/۱٤۹**
ژنوتیپ × محیط کشت	۸	۱/۹۰۱ **	۹/۸۳۸ **	۰/۰۸۳ **
اشتباه آزمایشی	۳۰	۰/۱۵۸	۰/۸۳٦	۰/۰۱۰

منابع مورد استفاده :

جی، ام، بونکا، پی، ون، ادرکاس ، ۱۳۸۳ ، کشت بافت درختان ، باقری ، عبدالرضا ،سید مهدی زیارت نیا ، محمد حسینی ، دانشگاه فردوسی مشهد

حسین آوا ، سونا ، بررسی تکمیلی و تعیین خصوصیات کمی و کیفی ارقام جمع آوری شدهء فندق در کلکسیون کرج ، سازمان تحقیقات و آمو زش کشاورزی ، ۱۳۸۳

قربانی ، احمد ، بررسی شناسایی و جمع آوری ارقام فندق در سطح کشور ، دفتر امور میوه های سردسیری و خشک ، ١٣٨٤

- Damiano ,C, E,Catenaro, J, Giovinazzi, A, Frattarelli and E,Caboni ,Micropropagation of Hazelnut (*Corylus avellana* L .) , Acta Hort , 686, 2005

-Rodriguez, R, Rodriguez, A,Gonzales, A and Perez, C,1989, Hazelnut (*Corylus avellana* L.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol, 5 , Trees II,p.127-160.In:Y.P.S.Bajaj(ed)