بررسی تأثیر محیط کشت و منبع کربوهیدرات بر کشت جوانه جانبی زیتون (*Olea ouropaea* L.) در شرایط *In vitro*

سیده رقیه حسینی کردخیلی (۱)، حسین صادقی (۲)، سیدکمال کاظمی تبار (۳)، علی رضا طلایی (٤)

۱- کارشناس ارشد رشته 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.

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. لذا جهت بهینه سازی محیط کشت درون شیشه ای یک رقم زیتون بومی ایران با نام رشید (*Olea ouropaea* cv. *Rashid*) آزمایشاتی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به این منظور، قلمه های حاوی جوانه های جانبی پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریدسدیم ۱۵٪ (۱۵ دقیقه) و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل به صورت قطعات گره دار درآمده و در محیط‌های کشت پایه OM و MS تغییریافته کامل شده با ۳ mg/L BAP و کربوهیدرات های ساکارز یا مانیتول (هر کدام در دو سطح ۳۰g/L و ۱۸) کشت شدند. نتایج نشان داد که هم محیط کشت و هم نوع و غلظت کربوهیدرات پُرآوری شاخساره و سرعت رشد ریزنمونه ها را تحت تأثیر قرار داده و سطوح مختلف ساکارز و مانیتول اثر معنی داری بر تعداد شاخساره و گره بوجود آمده از هر ریزنمونه دارند. بهترین نتایج استقرار و واکشت در محیط های کشت دارای مانیتول به‌دست آمد و محیط کشت MS تغییریافته دارای ۳۰g/L مانیتول توانست بهترین وضعیت رشدی را در هر دو مرحله استقرار و واکشت را برای ریزنمونه ها فراهم کند.

کلمات کلیدی: *Olea ouropaea* CV. *Rashid*، محیط کشت OM و MS، مانیتول، ساکارز.

مقدمه:

زیتون(*Olea ouropaea* L.) درختی همیشه سبز با عمری طولانی از تیره *Oleaceae* می‌باشد. روش‌های کشت درون-شیشه‌ای با توجه به توانایی‌های که در رابطه با نجات جنین، تولید گیاهان هموزایگوس، ایجاد تنوع سوماکلونال و حذف پاتوژن‌های سیستمیک دارد، می‌تواند کمک مؤثری در برنامه‌های به‌نژادی زیتون، که تاکنون با استفاده از روش‌های سنتی پیشرفت قابل توجهی نداشته است، باشد(۱۱). ریزازدیادی یک روش نسبتاً جدید برای ازدیاد زیتون است که هنوز جایگزین سیستم‌های متداول تکثیر نشده و کاربرد آن در سطح وسیع نیاز به بهینه‌سازی دستورالعمل‌ها و سازگارنمودن آنها با نیازهای خاص ارقام مختلف زیتون دارد(۱۲). در بررسی‌های انجام شده تاکنون با استفاده از محیط‌های کشت و ریزنمونه‌های متفاوت، چندین روش در کشت درون شیشه‌ای زیتون بدست آمده است. کشت جوانه جانبی و پرآوری آن یکی از متداول‌ترین، سریعترین و کارآمدترین روش‌های ریزازدیادی در زیتون می‌باشد. 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 (۳،۱،٦ و۸). بنابراین در تحقیق حاضر تأثیر دو محیط کشت مختلف حاوی غلظت‌های مختلفی از ساکارز و مانیتول در ریزازدیادی یک رقم زیتون با نام رشید (*Olea ouropaea* cv. *Rashid*) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها:

در این آزمایش قلمه‌هایی از درختان بالغ زیتون رقم رشید موجود در باغ کلکسیون ارقام زیتون در دانشکده کشاورزی ساری، جمع‌آوری و پس از حذف برگ‌ها، قلمه‌ها با بنومیل ۱٪ (۲۰ دقیقه) پیش تیمار شده و در الکل ۷۰٪ (۳۰ ثانیه) قرار گرفتند. سپس قلمه‌ها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱۵ درصد (۱۵دقیقه) غوطه‌ور شده و در نهایت ۳ بار با آب سترون (به مدت ۳ دقیقه) شستشوی شدند. پس از ضدعفونی ریزقلمه‌ها، جوانه‌های جانبی به صورت قطعات تک‌گره درون دو محیط کشت پایه OM(Rugini,1984) و MS تغییریافته (Leva and Fiorino,1986) حاوی۳mg/l BAP با سطوح مختلف (۳۰g/l و۱۸) کربوهیدرات‌های ساکارز و مانیتول،g/l ۸ آگار با pH =۵/۷ کشت شدند(جدول ۱). سپس ۵ هفته پس از تیمار ریزشاخه‌های بوجود آمده درون همان محیط‌های کشت ولی با g/l ۳۰ ساکارز یا مانیتول واکشت شدند و به مدت ۸ هفته در اتاقک رشد با دمای ۲٤±۲°c و شرایط نوری ١٦ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تعداد شاخساره و تعداد گره بوجود آمده از ریزنمونه، ببه عنوان شاخص رشدی در نظرگرفته شد. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی، با ۱۰ تکرار و بررسی اختلاف میانگین داده‌ها، بر اساس نرم افزار SPSS و گروه‌بندی نمونه‌ها براساس آزمون دانکن انجام شد.

نتایج:

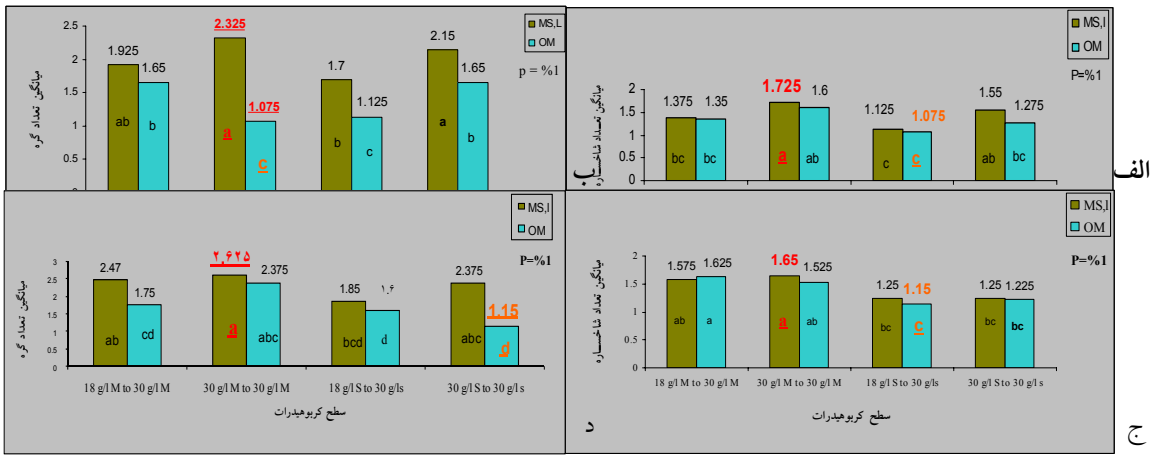
نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که شاخص‌های رشدی مورد بررسی در مرحله استقرار و واکشت در سطح آماری ۱٪ معنی‌دار می‌باشند(جدول۱). با توجه به نتایج بدست آمده در مرحله استقرار، بیشترین میانگین تعداد شاخساره (۱/۷۲۵) در محیط‌کشت MS,l دارای ۳۰g/l مانیتول و کمترین آن(۱/۰۷۵) در محیط‌کشت OM دارای ۱۸g/l ساکارز بدست آمد.(نمودار۱-الف). همچنین بیشترین میانگین تعداد گره (۲/۳۲۵) در محیط‌کشت MS,l دارای ۳۰g/l مانیتول و کمترین آن (۱/۱۲۵) در محیط‌کشت OM دارای ۱۸g/l ساکارز بدست آمد(نمودار۱-ب). بررسی نتایج واکشت نیزنشان داد که بهترین میانگین تعداد شاخساره (۱/٦٥) در واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه MS,l با مانیتولg/l ۳۰ 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 ۱۸g/l ساکارز به همان محیط با ساکارز ۳۰g/l مشاهده شد(نمودار۱-ج). در مورد شاخص رشدی تعداد گره، بیشترین میانگین (۲/٦۲٥) مربوط به واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه MS,l (مانیتولg/l ۳۰)به همان محیط با مانیتول ۳۰g/l و کمترین آن (۱/۱۵) در واکشت ریزنمونه‌ها از محیط کشت پایه OM با g/l ۳۰ ساکارز به همان محیط با ساکارز ۳۰g/l بدست آمد(نمودار۱-د).

به طور کلی محیط کشت نقش مهمی در ریزازدیادی زیتون بازی می‌کند(۵). محیط‌های کشت مختلف مورد استفاده برای ارقام مختلف زیتون در توانایی سازگاری در نیازهای کشت درون‌شیشه‌ای تفاوت‌هایی نشان می‌دهند(گریگوریادو،۲۰۰۲). در مقایسه بین محیط‌ها با توجه به ارزیابی شاخص‌های رشدی در هر دو مرحله، محیط MS تغییر یافته بر OM ارجح و وضعیت رشد ریزنمونه‌ها بدون در نظر گرفتن منبع کربوهیدراتی در این محیط بهتر بود(۲و٤). در مرحله استقرار، در محیط-های کشت دارای مانیتول و ساکارز با ۳۰g/l در مقایسه با محیط‌های کشت با غلظتg/l ۱۸ بهتر بود. در هر دو محیط کشت افزایش غلظت مانیتول از ۱۸g/l به g/l ۳۰ 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(۹). بهترین دلیل برتری محیط کشت MS,l در مراحل استقرار و پرآوری ریزنمونه‌ها در این تحقیق را می‌توان به قدرت یونی کمتر آن نسبت به محیط OM دانست. زیرا هرچه غلظت نمک‌ها در محیط‌کشت امکان جذب آب و مواد غذائی بیشتری برای ریزنمونه‌ها فراهم می‌شود و جذب آب حفظ حالت تورژسانس سلول‌های ریزنمونه را ممکن می‌سازد و از این طریق به رشد آن‌ها کمک می‌کند. غلظت بالای نمک‌ها باعث افزایش تولید ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌شود (سنویراتنه و ویجسکارا، ١٩٩٦). در

مقایسه دو کربوهیدرات، مانیتول اثر مثبتی در تولید تعداد گره‌ها نشان داد (۹). مانیتول محصول اصلی فتوسنتز در درختان زیتون است که به وسیله آوندهای آبکش انتقال می‌یابد (۷). مانیتول در بافت‌های ریزنمونه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای به غلظت‌های بالایی می‌رسد که برای کربوهیدرات‌های دیگر سوخت‌وساز می‌شود (Leva و همکاران، ۱۹۹۵). هنوز مشخص نشده است که چرا مانیتول رشد ریزنمونه‌های درون شیشه‌ای را بیشتر از ساکارز افزایش می‌دهد (۸)، شاید به دلیل این‌که مانیتول مانند تنظیم کننده‌های رشد عمل کرده و غالبیت انتهایی و تولید کالوس را کاهش می‌دهد(۱۰).

جدول۱: تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی در مرحله استقرار و واکشت

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



نمودار۱. الف و ب – مقایسه میانگین تعداد شاخساره و تعداد گره در دو محیط کشت MS,L و OM در مرحله استقرار

ج و د – مقایسه میانگین تعداد شاخساره و تعداد گره در دو محیط کشت MS,L و OM در واکشت

فهرست منابع

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

۲ تیموری، م. ۱۳۸۳. ریزازدیادی یک رقم ایرانی زیتون با کشت میانگره. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

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

٤- کیانی‌فریز. م. ۱۳۸۱. بررسی تکثیر درون شیشه‌ای چند رقم زیتون. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته باغبانی. دانشگاه تهران.

5- Charbaji, T., Z. Aoubi and I. Karajouli. 2008. In vitro propagation of some Srian varieties of olive *(Olea europaea* L.) . Acta Agronomica Hungarica,56(1),pp. 107-11.

6-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.
7-Flora, LL., MA, Madore. 1993. Stachyosa and mannitol transport in olive (*Olea europaea* L.). Planta 189: 484–490.
8-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.
9-Leva. A.R., R. Petruccelli and G. Bartolini. 1994. Mannitol in *in vitro*culture of *Olea europaea* L. (Cv. Maurino). Acta Hortic. 356:43–46.
10-Leva A.R., R.Petruccelli and L.Polsinelli. 2004. In vitro propagation: From the Loboratory to the production line. OLIVE. No. 101. pp 18-26.
11-Rugini, E., P. Gutierrez-Pesce and P.L, Sampinato. 1999. New perspective for biotechnologies in olive breeding: morphogenesis, in vitro selection and gene transformation. Acta Hort.474, 107–110.
12-Zuccherelli, G and Zuccherelli, S. 2002.In vitro propagation of fifty olive cultivars. Acta Hort 586:931-934.