ریز افزایی زیتون (*Olea europaea* L. cv. Mission) با استفاده از قطعات تک گره

احمدعلی رستمی (۱)، علیرضا شهسوار (۲)
۱و۲- دانشجوی دکتری و استادیار بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

غالبا ارقام زیتون (*Olea europaea* L.) با استفاده از قلمه چوب سخت در شرایط کنترل شده مثل گلخانه های مجهز به سیستم مه افشان تکثیر می شوند. پژوهش حاضر به منظور ایجاد روشی موفق و پر بازده در ریز افزایی رقم Mission زیتون با استفاده از قطعات میانگره انجام شد. نتایج نشان دادند که تولید ترکیبات فنولی و سیاه شدن ریز نمونه ها را می توان با غوطه ور نمودن ریز نمونه ها برای ۲ ساعت در آب و سپس در آمیخته ۱۰۰ میلی گرم در لیتر سیتریک اسید و آسکوربیک اسید به مدت ۳۰ دقیقه مهار نمود. بهترین نتایج رشد و پرآوری ریز نمونه ها در حضور بنزیل آدنین، جیبرلیک اسید و نفتالین استیک اسید بترتیب به غلظت ۲/۱، ۲/۰۸، و ۰/٦ میلی گرم در لیتر به دست آمد. ریزنمونه های پرآوری کرده روی محیط MS نیم غلظت در حضور ایندول بوتیریک اسید به غلظت ٤ میلی گرم در لیتر ریشه دار شدند. ریزنمونه های ریشه دار شده زیر سیستم مه افشان و خنک کننده معمولی، در گلخانه ریشه دار شدند. روش ارائه شده در این پژوهش برای ریزافزایی زیتون رقم میشن برای تولید انبوه و ریشه زایی رقم میشن زیتون طی یک دوره سه تا چهار ماه کارآیی بالایی دارد. اما کارآیی آن در مورد ریزافزایی سایر ارقام زیتون نیز باید مورد ارزیابی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: زیتون، کشت بافت، ریزافزایی، نانونقره، کنترل آلودگی، کنترل ترکیبات فنولی، ریشه زایی، سازگار کردن.

مقدمه:

افزایش زیتون به روش های مختلفی صورت می گیرد. این گیاه را می توان با استفاده از بذر، قلمه ساقه، افکندن، پیوند زدن، و جدا کردن پاجوش ها افزود. در سال های اخیر، از روش های کشت بافت برای همگروه سازی سریع بسیاری از درختان میوه از جمله زیتون به کار گرفته شده است. در بسیاری از ارقام زیتون، ریزافزایی از طریق جوانه های جانبی، به عنوان ریزنمونه به سبب سرعت رشد کم، پر آوری ضعیف، تاخیر و کاهش در میزان ریشه دهی درون شیشه ای به عنوان یک روش، کارایی زیادی نداشته است (Cozza *et al*., 1997). سرعت باززایی شاخساره زیتون کند است و به شدت وابسته به رقم می باشد، به دست آوردن ریشه های نابجا نیز مشکل می باشد و همچنین تعداد زیادی از گیاهان طی انتقال به فضای باز از بین می روند (Rugini *et al*., 1999). این پژوهش به منظور یافتن بهترین روش کنترل تولید مواد فنولی، یافتن بهترین ترکیب تنظیم کننده های رشد برای پرآوری شاخساره، ارائه غلظت تنظیم کننده رشد مناسب برای ریشه زایی رقم میشن انجام شد.

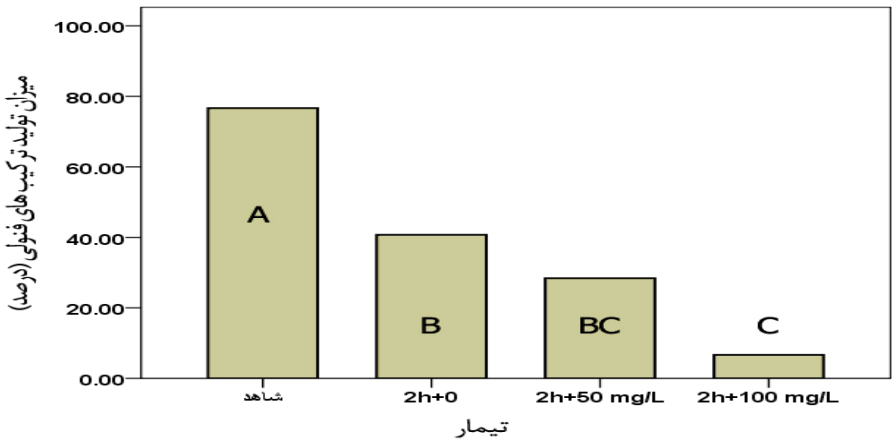
مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی مورد نیاز برای این پژوهش از شاخه های تازه رشد کرده درختان زیتون رقم میشن ۹ ساله بارور از محل ایستگاه تحقیقات زیتون کازرون تهیه شدند. ریز نمونه های مورد استفاده، قلمه های تک گره بودند. نمونه ها روی محیط کشت MS نیم غلظت با pH ۵/۷ کشت شدند. پس از شست و شوی اولیه برای گندزدایی سطحی، نمونه ها در الکل ۷۰٪ و کلراکس (سفید کننده تجاری گلرنگ حاوی ۵/۲۵٪ هیپوکلریت سدیم) ۱۰٪ به ترتیب برای ۱ و ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. به منظور کنترل ترکیبات فنولی، ریز نمونه ها پس از ۲ ساعت غوطه وری در آب در آمیخته اسید سیتریک و اسید آسکوربیک به غلظت های ۰، ۵۰، و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر از هر کدام قرار داده و سپس کشت شدند. برای تعیین میزان بهینه تنظیم کننده های رشد مورد نیاز در محیط کشت پرآوری، غلظت های مختلف بنزیل آدنین و اسید جیبرلیک در حضور غلظت ثابت نفتالن استیک اسد ارزیابی شد. اثر تنظیم کننده رشد NAA به غلظت ۰/٦ میلی گرم در لیتر به همراه BA به غلظت های ۰، ۰/۷، ۱/٤ و ۲/۱ میلی گرم و GA_3 در غلظت های ۰، ۱/۰٤، و ۲/۰۸ میلی گرم در لیتر، همراه با هم مورد بررسی قرار گرفت. ریزنمونه ها پس از گذشت ٤ هفته در محیط پرآوری اولیه، زیر کشت شدند و به محیط جدید انتقال یافتند. ریشه زایی روی محیط MS/2 انجام شد. به این محیط کشت غلظت های مختلف (صفر، ۲، ٤ و ٦ میلی گرم در لیتر) افزوده شد تا بهترین غلظت IBA در ریشه زایی به دست آید. پس از ریشه زایی گیاهچه ها در داخل گلدانهای کاغذی حاوی ورمی کولایت و یا گلدان های قرصی برای سازگاری بهتر با محیط بیرون، همراه با رشد گیاهچه ها، به طور تدریجی از میزان رطوبت نسبی و آبیاری کاسته شد. برای این منظور با استفاده از سنسور

رطوبتی و تنظیم آن، رطوبت نسبی به مرور زمان طی ۳ هفته ابتدا از ۹۵٪ به ٦۰٪ و در نهایت به ۳۰٪ رسانده شد. طرح آماری که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت، از نوع کاملا تصادفی با ده تکرار و در هر تکرار ۳ ریزنمونه بود. آزمون تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱٦ انجام شد و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث:

در کشت بافت زیتون نیز یکی از مهمترین مسائل، تولید این مواد و قهوه ای شدن و مرگ ریز نمونه ها می باشد (Roussos and Pontikis, 2001). برای کنترل تولید این مواد، راه کار های متفاوتی مثل استفاده از آنتی اکسیدان ها در محیط کشت، نگهداری ریزنمونه ها در تاریکی و زیر کشت های متعدد، غوطه ور کردن در آب و غیره را اشاره نمود. در پژوهش حاضر استفاده از آسکوربیک اسید به همراه اسید سیتریک به عنوان آنتی اکسیدان پس از ۲ ساعت غوطه وری در آب، میزان تولید ترکیبات فنولی را به صورت قابل ملاحظه ای (بیش از ۹۰ درصد) کاهش داد (شکل ۱). استفاده از تیمار غوطه وری در آب به کم شدن غلظت مواد بازدارنده در ریزنمونه یا پیش ساز این مواد در ریزنمونه ها کمک می کند. Roussos و Pontikis (۲۰۰۱) نیز توانستند با کمک آنتی اکسیدان ها، تولید ترکیبات فنولی را در محیط کشت زیتون کاهش دهند.



شکل ۱. اثر غلظت های مختلف آمیخته اسید سیتریک و اسید آسکوبیک پس از ۲ ساعت غوطه وری در آب، بر تولید ترکیبات فنولی.

کاربرد جیبرلیک اسید به همراه بنزیل آدنین و نفتالن استیک اسید میزان پرآوری شاخساره، تعداد برگ (داده ها نشان داده نشده اند)، و طول شاخه ها را افزایش داد (جدول های ۱ و ۲). با توجه به نتایج این پژوهش، استفاده از سایتوکاینین در محیط پرآوری شاخساره زیتون الزامی است. پیش از این زآتین برای پرآوری شاخساره زیتون پیشنهاد شده بود ولی زآتین قیمت زیادی دارد و این مسئله، استفاده تجاری از آن را محدود می سازد. به منظور جایگزین کردن زآتین، پژوهش های گسترده ای انجام شده است. اما در این پژوهش استفاده از BA توانست نتایج خوبی را به دست آورد. به طور کلی میزان رشد نمونه ها به دنبال این تیمار سایتوکاینین و آکسین در حد مطلوبی نبود. با کاربرد اسید جیبرلیک به همراه این مواد، علاوه بر اینکه رشد شاخساره افزایش یافت، به دنبال آن تعداد گره و میزان تشکیل برگ نیز به صورت معنی داری افزایش پیدا کرد.

قابلیت ریشه زایی با افزایش میزان IBA در محیط MS/2 افزایش یافت (جدول ٤). اما در غلظت بالاتر، از طول و تعداد ریشه ها کاسته شد. بیشترین وزن تر ریشه در تیمار ۲ میلی گرم در لیتر IBA بدست آمد و کمترین آن مربوط به تیمار ٦ میلی گرم در لیتر IBA بود. به طور کلی انگیزش ریشه در محیط های حاوی آکسین یا فاقد آکسین بسته به ژنوتیپ گیاه تغییر می کند. پژوهش های مختلف، IBA را به عنوان موثرترین هورمون در ریشه زایی درون شیشه ای زیتون معرفی کرده اند. قابلیت بالای ریشه زایی که در این پژوهش مشاهده شد می تواند به دنبال تیمار اسید جیبرلیک شکل گرفته باشد. Leva و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که پس از تیمار جیبرلیک اسید، ریشه بیشتری در کشت درون شیشه ای ارقام زیتون حاصل می گردد. گیاهچه هایی که به شرایط گلخانه انتقال داده شده بودند پس از ۳ هفته با موفقیت و با حدود ۲۰٪ تلفات به محیط بیرون انتقال داده شدند. میزان تلفات گیاهچه های زیتون در فرآیند سازگار شدن بین ۰ تا ۲۵ درصد تغییر می کرد. بنابراین میزان بقاء نهال ها که در این پژوهش مشاهده شد با نتایج ذکر شده

در یک راستا قرار دارد. پروتوکلی که در این پژوهش ارائه شد قابلیت بالایی در ریزازدیادی رقم میشن نشان داد. اما کارآیی آن را باید در مورد ریزافزایی سایر ارقام زیتون نیز مورد ارزیابی قرار داد.

جدول ۱. برهمکنش غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد بر میزان پر آوری شاخساره.

		جیبرلیک اسید (میلی گرم در لیتر)							
		۰		۱/۰٤		۲/۰۸		میانگین	
بنزیل آدنین (میلی گرم در لیتر)	۰	cd	†۰/۸	d	۰/۷۳	d	۰/۷۳	C	۰/۷۵
	۰/۷	bcd	۱/۲	bcd	۱/۲	bcd	۱/۲	B	۱/۲
	۱/٤	bcd	۱/۲٦	abc	۱/٤٦	ab	۱/٦٦	AB	۱/٤٦
	۲/۱	bcd	۱/۳	abc	۱/٤٦	a	۲/۰	A	۱/٦
	میانگین	A	۱/۱۵	A	۱/۲۱	A	۱/٤		

جدول ۲. برهمکنش غلظت های مختلف تنظیم کننده های رشد بر طول شاخساره (میلی متر).

		جیبرلیک اسید (میلی گرم در لیتر)							
		۰		۱/۰٤		۲/۰۸		میانگین	
بنزیل آدنین (میلی گرم در لیتر)	۰	e	۲/۱†	b-e	٤/۷	bcd	٦/۸	B	٤/٥٦
	۰/۷	cde	۳/۷	b-e	٥/۱	bcd	۷/۱	B	٥/۳۱
	۱/٤	cde	٥/۱	cde	٥/۷	b	۸/۰	AB	٦/۳
	۲/۱	de	۳/٥	bc	۷/۷	a	۱۲/٥	A	۷/۹
	میانگین	C	۳/٦	B	٥/۸	A	۸/٦		

جدول۳. فعالیت ریشه زایی در محیط MS نیم غلظت و در حضور مقادیر مختلف IBA.

غلظت IBA (mg L^{-1})	وزن تر (mg)	پینه زایی (٪)	طول ریشه (cm)	تعداد ریشه در ریزنمونه	تولید ریشه (٪)
۰	b۰/۰	c۰/۰	c۰/۰	c۰/۰	c†۰/۰
۲	a۱۳۹/٤	b۸/۰	ab ۱/٦۳	a۲/٤	ab۸۰/۳
٤	a۱۳۱/۸	ab۱۰/۳	a۱/۹۳	a۲/٦	ab۸٥/۰
٦	a۱۲۱/۸	a۱٥/۹	ab۱/٤۸	b۱/۹	a۹۳/۰

منابع:

Cozza, R. D. TTurco, C.B. Bati and M.B. Bitoni. 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plants. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 51: 215-223.

Roussos, P.A. and C. A. Pontikis. 2001. Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage *in vitro*. Gartenbauwissenschaft, 66(6): 298–303.

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

In vitro micropropagation of Olive (*Olea europaea* L. cv. Mission) by nodal segments

Ahmad Ali Rostam, and Ali reza Shahsavar
Department of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Abstract

Olive (*Olea europaea* L.) cultivars are mainly propagated by hardwood cuttings under controlled conditions such as greenhouses equipped with mist unit. Current study was conducted to establish a successful and high efficient commercial protocol for micropropagation of olive 'Mission' via nodal segments. Results of this study showed that production of phenolic compounds and necrosis of explants may be controlled by submersing the explants in a mixture of 100 mg L^{-1} citric acid and ascorbic acid for 30 minutes, after 2 hours submersion in water. The best proliferation rate and growth of explants obtained in the presence of benzyladenine, gibberellic acid and naphthalene acetic acid at the rate of 2.1, 2.08, and 0.6 mg L^{-1}, respectively. Proliferated explants rooted on MS/2 supplemented by 4 mg L^{-1} indolbutyric acid. Rooted explants adapted to outdoor condition by placing them under ordinary mist unit and cooling system of greenhouse. The protocol introduced here is suitable for high efficiency bulk propagation of olive 'Mission' in a period of three to four months; however the applicability of the protocol should be evaluated for other olive cultivars.

Keywords: Olive, Micropropagation, Phenolic compounds, Proliferation, Rooting, Plant growth regulators composition.