بررسی عوامل مؤثر روی مرگ ریز نمونه ها در ریز ازدیادی گردوی ایرانی

شادی محمدی نژاد (۱)، منصور غلامی (۲)، محمود اثنی عشری (۲)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه بو علی سینا همدان، ۲- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه بوعلی سینا همدان

با هدف بررسی ریز ازدیادی دو ژنوتیپ برتر گردوی ایرانی (Z60 و منتخب 305) در منطقه تویسرکان استان همدان، از شاخه های حاصل از رشد سال جاری در بهار قلمه های تک گره تهیه شد. پس از انجام مراحل ضد عفونی، نمونه ها در محیط های DKW و WPM کشت شدند. طی مرحله ی پرآوری شاخساره، بیشترین میزان ترشح فنول و به تبع آن بالاترین درصد تلفات ریز نمونه مشاهده شد، اما ژنوتیپ منتخب 305 فنول کمتری تولید کرد و به همین دلیل نسبت به ژنوتیپ Z60 از رشد شاخساره ی بیشتر و سریعتری هم برخوردار بود. همچنین در روند آزمایش مشکل جدیدی که سیاه شدن نمونه ٢٤ ساعت پس از انتقال به محیط ریشه زایی بود بروز کرد. این فرآیند از نوک برگ ها شروع شد و به سمت ساقه پیش رفت و طی ٦-٣ روز تمامی نمونه ها را از بین برد. به منظور بررسی برخی عوامل محدود کننده رشد ریز نمونه‌ها در محیط کشت تغییراتی مانند غلظت عناصر ماکرو، غلظت هورمون IBA و BA و مقدار آگار ارزیابی شد. نتایج نشان داد که این عوامل در بروز این حالت تأثیری ندارند و برای مشخص نمودن علت آن بررسی های بیشتری لازم است.

کلمات کلیدی: ریزازدیادی، گردوی ایرانی، ژنوتیپ، فنول

مقدمه:

گردو گیاهی از خانواده Juglandacea و جنس *Juglans* بوده و مهمترین گونه آن *J.regia* است. احتمالاً منشا گردو مناطق ایران و افغانستان بوده است (مک گراناهان، ۱۹۸۷). متاسفانه به علت تکثیر گردو از طریق بذر در کشور از گذشته‌های دور تا به حال، باغات موجود از نظر صفاتی همچون اندازه درخت، زمان گلدهی، زمان رسیدن و برداشت میوه، کیفیت میوه و مقاومت به برخی تنش‌ها فاقد یکنواختی می‌باشند. استفاده از روش‌های کشت بافت بخصوص در مورد این گونه از گردو به حل این مشکل کمک خواهد کرد. در این روش می‌توان از قطعات مختلف گیاه مانند ساقه، ریشه، برگ، جوانه، لپه و آندوسپرم برای کشت در شرایط آزمایشگاهی استفاده نمود. کشت جوانه به جهت همسانی گیاه حاصل از آن به والد اهمیت ویژه‌ای دارد (امام، ۱۳۸۳). اولین تحقیقات در زمینه کشت بافت گردو توسط اشبی و کومینوس (١٩٩٦) صورت گرفت. آنان با کشت شاخه‌های پوست دار گردوی سیاه به کالوس دست یافتند. درایور و کنیوکی (١٩٨٤)، محیط کشت‌های متفاوتی را برای کشت ریز نمونه های دارای گره از دانهال گردوی پارادوکس بررسی کردند و نشان دادند که محیط کشت‌های WPM (لوید ومک کاون، ۱۹۸۱) و B5 (گامبورگ و همکاران، ١٩٦٨) نسبت به محیط کشت‌های MS (موراشیک و اسکوگ، ١٩٦٢) و چنگ بهتر است. اگرچه پرآوری شاخه‌ها در این محیط‌ها صورت گرفت اما واکشت متعدد شاخه‌ها منجر به زوال تدریجی آن‌ها شد و در نهایت محیط DKW (درایور و کنیوکی،١٩٨٤) بطور ویژه برای گردو اختصاص یافت که سرعت رشد نمونه‌ها در آن‌ها ٤ برابر سایر محیط‌ها بود. در حال حاضر فقط یک شرکت اسپانیایی نهال‌های کشت بافتی گردو را در سطح تجاری تولید می‌کند. این تحقیق به منظور بررسی شرایط بهینه جهت تولید نهال‌های کشت بافتی گردو صورت گرفت.

مواد و روش‌ها:

ریز نمونه‌های آزمایشی به صورت قلمه های تک گره از ژنوتیپ های گردوی Z60 و منتخب 305 کلکسیون مرکز تحقیقات گردو واقع در شهر تویسرکان تهیه شدند. ضدعفونی ریز نمونه‌ها در چهار مرحله و به صورت زیر انجام شد. ابتدا نمونه‌ها در محلول ۲ در هزار پاک کننده به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس ضد عفونی سطحی آن‌ها با الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه تا ۲ دقیقه انجام شد و متعاقب آن ضد عفونی با محلول هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت و نهایتاً پس از شستشو با آب مقطر استریل در ۳ مرحله به محیط کشت منتقل شدند.

پرآوری شاخساره:

قلمه‌های تک گره تهیه شده روی محیط کشت نیمه جامد DKW حاوی غلظت‌های ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر IBA و ۰/۱ و۰/۲ میلی گرم در لیتر BA به علاوه‌ی۳ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و ۱ گرم در لیتر پلی وینیل پیرولیدین کشت شدند و به اتاقک رشد با دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی و دمای ٢٤±٢ درجه سانتیگراد انتقال یافتند. برای جلوگیری از تجمع مواد فنلی نمونه‌های کشت شده به فواصل ۵ تا ١٤ روز یکبار در محیط‌های مشابه واکشت می شدند.

ریشه زایی:

نمونه‌های پرآوری شده برای تولید ریشه به محیط ریشه زایی DKW با غلظت‌های x ۱/۲ و x ۱/٤ عناصر ماکرو و حاوی ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر IBA، ۸ گرم در لیتر آگار و ۳ گرم در لیتر ساکارز منتقل شدند. برای القا ریشه، نمونه‌ها به مدت ٤ روز در تاریکی کامل و سپس به مدت ٦ روز در دوره نیم تاریکی قرار گرفتند.

نتایج و بحث:

در این تحقیق نمونه‌های دو ژنوتیپ Z60 و منتخب 305 تفاوت چشمگیری در رفتار در محیط‌های رشد نشان دادند، بطوریکه Z60 یک روز بعد از کشت فنول ترشح کرد و در روز بعد این مقدار در سطح وسیعتری از محیط منتشر شد وباعث سیاه شدن ریزنمونه‌ها گردید. منتخب 305 با روند آهسته تر و مقدار کمتر فنول تولید کرد. در مقایسه، ۷۰٪ ریز نمونه‌های Z60 در اثر ترشح فنول از بین رفتند، در حالیکه این تلفات برای 305 ۳۵٪ بود. اگرچه گردو گیاهی است که تکثیر غیر جنسی آن نظیر استفاده از قلمه و پیوند بدلیل تولید فنول از بافت‌های برش خورده بسیار دشوار است، اما گونه‌های مختلف و در سطح وسیع تر انواع ژنوتیپ‌ها از نظر تولید این ماده متفاوت عمل می‌کنند. در واقع نقش ژنوتیپ بعنوان یک عامل در تمام فازهای ازدیاد رویشی کاملا مشخص است (براون، ۱۹۸۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که علارغم وجود این تفاوت‌ها باید در مورد روش‌های کاهش ترشح فنول و یا حذف آن از محیط بررسی بیشتری صورت گیرد. از طرفی در طی دوره القا ریشه پس از گذشت چهار روز از دوره تاریکی در اتاقک رشد، ریز نمونه‌ها از نوک برگ‌ها شروع به سیاه شدن کردند که این فرآیند به سمت ساقه ادامه پیدا کرد. همچنین در این روند کالوس‌های تولید شده نیز قهوه‌ای شده و از بین رفتند. طی بررسی عوامل موثر در بروز این مشکل چنین تصور شد که عدم تهویه مناسب در شیشه‌ها، دمای بالای اتاقک رشد و غلظت بالای هورمون IBA می‌توانند این عارضه را ایجاد کنند. با توجه به گزارش وحدتی(۱۳۸۲) که از ۳ میلی گرم در لیتر IBA در محیط ریشه-زایی استفاده کرده و با چنین مشکلی مواجه نگردیده و نیز در بسیاری از تحقیقات دیگر هم از غلظت‌های بالاتری استفاده شده است، بنظر نمی‌رسد که این مشکل به دلیل غلظت بالای IBA بروز کرده باشد. از طرفی همراه با بزرگتر شدن گیاهچه‌ها از شیشه‌های بزرگتری استفاده شد و لذا احتمال اینکه مشکل عدم تهویه مناسب باعث بروز مشکلات مزبور بوده است هم ضعیف گردید. با کنترل عوامل مختلف تنها مورد مشکوک افزایش دما تا ٢٦ درجه سانتیگراد در طول آزمایش است که احتمال داده می‌شود در این شرایط افزایش جزئی دما موجب بروز این آثار و مرگ گیاهچه‌ها شده باشد که در آزمایشات بعدی موضوع بیشتر و بطور دقیق تر بررسی خواهد شد.

منابع:

- وحدتی، کوروش (۱۳۸۲)." بررسی عوامل موثر بر ریشه زایی و اندام زایی ارقام و ژنوتیپ های گردو".پایان نامه دکتری علوم باغبانی-گرایش اصلاح و بیوتکنولوژی درختان میوه. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.ص ص: ۱۲۰-۷۰

- Amiri, M. E. (2006) "Effect of mineral concentration on tissue-cultured walnut (Juglans regia var. Zeiabadi) growth". Acta Hortic. 705: 383–386;

- Bosela, M. J., Michler, C. H. (2008) "Media effects on black walnut (Juglans nigra L.) shootculture growth in vitro: evaluation of multiple nutrient formulations and cytokinin types". In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 44:316–329.

Study of the factors affecting explants, death through Persian walnut micropropagation

Shadi Mohammadi nejad[1], Mansour Gholami[2], Mahmood Esna-Ashari[2]

1-MSc student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina university, Hamedan, Iran

2-Associate Professors, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina university, Hamedan, Iran

Abstract

With the aim of walnut micropropagation study in tow desirable Iranian genotypes(Z60 and selected 305)from the region of Tuyserkan in Hamedan province, single node cutting were prepared from newly grown branches in spring. Following samples sterilization, they cultured on to DKW and WPM media.The highest amount of releasing phenol followed by the maximum percentage of explants'death were observed through shoot multiplication , but the selected 305 genotype produced lower phenol, and for this reason, it had a higher shoot growth compared to Z60genotype. Samples' blacking was a new problem happened 24 hours after the explants weretransfered on to the rooting culture medium. This phenomenon was occurred in all explants starting from leaves tips to stems then causing death over the period of 3-6 days.In order to study some factors limiting explants' growth, a number of alterations such as IBA, BA and macronutrients concentrations and the amount of agar were made to the culture media. Results showed that none of the above factors affected the explant'death , so, more investigations is necessary to recognize the reason of this phenomenon.

Key words: micropropagation, Persian walnut, genotype, phenol