

تأثیر غلظت‌های مختلف بنزیل آدنین، محیط‌کشت، منابع کربوهیدرات و مواد نیمه‌جامدکننده محیط‌کشت بر افزونش شاخساره در زیتون رقم دزفول

The Effects of Different Concentrations of BA, Nutrient Media, Carbohydrate Sources and Gelling Agents on Shoot Multiplication of Olive (*Olea europaea* L. cv Dezful).

ایرج سعیدی^۱، یوسف علی سعادت^{۲*} و غلامرضا بخشی خانیکی^۳

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۰۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۱

چکیده

زیتون یکی از درختان مهم میوه در ایران است و سطح زیر کشت آن در ۱۵ سال گذشته حدود ۳۰ برابر شده است. رقم دزفول، یکی از ارقام تجاری زیتون است که در مناطق جنوبی ایران سازگاری خوبی نشان داده و برای روغن‌گیری و کنسروسازی مناسب است. ازدیاد رویشی این رقم به دلیل سخت ریشه‌زا بودن با استفاده از قلمه دشوار و تکثیر انبوه آن را برای کشت در سطح تجاری مشکل نموده است. ریزازدیادی از تکنیک‌های جدید و قابل اعتماد در سطح جهان است و برای تکثیر رویشی گیاهان در سطح انبوه کاربرد دارد. این پژوهش به منظور مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف BA، محیط‌کشت، منبع کربوهیدرات و مواد نیمه‌جامدکننده محیط‌کشت بر تکثیر شاخساره زیتون رقم دزفول انجام شد. نوک شاخساره و قطعه‌های ساقه شاخه‌های رشد فصل جاری درختان بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها، محیط‌کشت گیاهان چوبی (WPM) دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA برای افزونش شاخساره، بهینه تشخیص داده شد. محیط‌کشت گیاهان چوبی برای تولید درون‌شیشه‌ای شاخساره به‌طور معنی‌دار نسبت به محیط‌کشت‌های MS یا MS با نصف غلظت عناصر ماکرو برتری داشت. ساکارز به مقدار ۳۰ گرم در لیتر مناسب‌ترین منبع کربوهیدرات برای کشت درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول بود که از نظر شاخص‌های طول شاخساره، وزن تر شاخساره و تعداد شاخساره در ریزنمونه به‌طور معنی‌دار بهتر از گلوکز و فروکتوز بود. مناسب‌ترین ماده نیمه‌جامدکننده محیط‌کشت فیتاژل به‌میزان ۲/۴ گرم در لیتر بود.

واژه‌های کلیدی: رشد درون‌شیشه‌ای، ساکارز، فیتاژل، WPM

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی (دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور واحد کرج)

۲. دکتری علوم باغبانی، دانشیار پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، شیراز

۳. دکتری علوم گیاهی، استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور واحد تهران، تهران

Email: y.saadat1336@gmail.com

* نویسنده مسوول

مقدمه

زیتون (*Olea europaea* L.) گیاهی است از منطقه شرق مدیترانه که از زمان‌های پیش از تاریخ مورد استفاده بشر قرار می‌گرفته است. این درخت عمر طولانی دارد و نسبت به خشکی، شوری و خاک‌های ضعیف مقاوم می‌باشد. دزفول یکی از رقم‌های تجاری زیتون است که سازگار به شرایط آب و هوایی گرم و نسبتاً گرم می‌باشد. زیتون درختچه‌ای بزرگ و پرشاخ و برگ با تاج متراکم، شکل برگ بیضوی دوکی، طول برگ متوسط و دارای میوه درشت و کشیده می‌باشد که برای روغن‌گیری و کنسروسازی مناسب است (صادقی Sadeghi, 2002). ازدیاد رویشی زیتون با استفاده از قلمه ساقه، پیوند زدن و جداکردن پاجوش‌ها امکان‌پذیر است (آوان و همکاران (Awan et al., 2001)، اما ازدیاد رقم دزفول به دلیل سخت‌ریشه‌زا بودن با استفاده از قلمه دشوار و تولید انبوه نهال رویشی آن عملی نیست. در سال‌های اخیر، از روش ریزافزایی برای همگروه‌سازی سریع بسیاری از درختان میوه استفاده شده است. تکنیک ریزافزایی در مورد زیتون هم توسط راجینی و لاهه (Rugini and Lavee, 1992) مورد استفاده قرار گرفته است. تأثیر محیط‌کشت‌های پایه شامل محیط‌کشت گیاهان چوبی (WPM) گزارش شده توسط لوید و مک کاون (Lloyd and McCown, 1981)، محیط‌کشت زیتون (OM) پیشنهاد شده توسط راجینی (Rugini, 1984)، موراشیگ و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) و MS نیم غلظت همراه با ۵ میلی‌گرم در لیتر زاتین بر پرآوری زیتون رقم Moroccan Pichline توسط برهدا و همکاران (Brhada et al., 2003) بررسی شد، آنها گزارش کرده‌اند که محیط‌کشت OM و MS نیم غلظت در مراحل اولیه پرآوری بسیار مفید بودند. در محیط‌کشت OM رشد شاخساره بهتر از سایر محیط‌کشت‌ها بود و در مراحل بعدی نیز هیچ‌گونه نشانه‌ای از شیشه‌ای شدن (Hyperhyricidity) بافت‌ها مشاهده نشد. گریگوریا دو و همکاران (Grigoria dou et al., 2003) اثر محیط‌های کشت WPM و OM و غلظت‌های مختلف سایتوکینین‌های بنزیل آدنین (6-Benzyl amino purine (BA)، زاتین و N6-(2-Isopentenyl) adenine) 2ip را به تنهایی و یا ترکیبی از آنها و با اسید جیبرلیک (GA₃) بر افزونش درون‌شیشه‌ای زیتون رقم *Chondrolia chalkidikis* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کرده‌اند که محیط‌کشت WPM دارای ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر زاتین مؤثرترین بود و ریزشاخساره‌های بیشتری تولید کرد.

مناسب بودن محیط‌کشت MS نیم غلظت دارای ۲/۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲/۰۸ میلی‌گرم در لیتر اسید جیبرلیک برای تولید شاخساره زیتون رقم Mission توسط رستمی و شهسوار (Rostami and Shshsavar, 2012) گزارش شده است. همچنین آنتونوپولو و همکاران (Antonopolou et al., 2012) گزارش نموده‌اند که محیط‌کشت زیتون (OM) دارای یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA برای استقرار و افزونش شاخساره زیتون رقم *Chondrolia Chalkidikis* با استفاده از قطعه‌های ساقه دارای دو گره مناسب است و در مقایسه با محیط‌کشت‌های MS و WPM برتری معنی‌دار داشت. ایشان گزارش کرده‌اند که محیط‌کشت MS برای ریزافزایی این رقم زیتون مناسب نیست و پدیده شیشه‌ای شدن خیلی شدید است.

برتری محیط‌کشت OM نیم غلظت برای افزونش شاخساره درختان بالغ زیتون نسبت به محیط‌کشت MS توسط گارسیا فریز و همکاران (Garcia-ferriz et al., 2002) گزارش شده است. ترکیبی از BA و TDZ در مقایسه با BA تنها مناسب‌تر بود و بهترین نتیجه از ترکیب ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر TDZ حاصل گردید.

برتری محیط‌کشت DKW گزارش شده توسط مک گرنهان و همکاران (McGranahan et al., 1987) در مقایسه با محیط‌کشت OM برای کشت درون‌شیشه‌ای زیتون زیرگونه *maderensis* توسط سن‌تو و همکاران (Santos et al., 2003) گزارش شده و غلظت یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA را برای طویل شدن شاخساره و تولید شاخساره بهینه یافتند. کشت درون‌شیشه‌ای چندین رقم فرانسوی و مراکشی زیتون توسط اسقیر و همکاران (Sghir et al., 2005) بررسی شد. آنها گزارش نموده‌اند که رقم‌های مختلف واکنش مختلف در کشت‌های درون‌شیشه‌ای نشان می‌دهند و حداکثر رشد و تولید شاخساره در غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف ساکارز و مانیتول برای کشت درون‌شیشه‌ای زیتون رقم Maurino توسط لوا و همکاران (Leva et al., 1994) بررسی و گزارش نموده‌اند که حداکثر تولید شاخساره با غلظت ۳۴ گرم در لیتر ساکارز یا مانیتول مشاهده شد، اما مانیتول در مقایسه با ساکارز در غلظت یکسان برتری داشت.

تاکنون در مورد تکثیر درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول در منابع علمی گزارشی مشاهده نشده و هدف از اجرای این پژوهش بررسی تأثیر محیط‌کشت‌های مختلف، منابع

۱. تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر تولید شاخساره درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

در این آزمایش تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول مورد بررسی قرار گرفت. از محیط‌کشت پایه WPM با ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه‌جامد شده با ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار استفاده گردید. غلظت‌های مختلف BA (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر)، مورد مقایسه قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار دارای ۴ ریزنمونه بود.

ریزنمونه‌های مورد استفاده در این آزمایش، قطعات ساقه دارای چند جوانه جانبی بودند که بعد از آماده‌سازی و گندزدایی بر روی محیط‌کشت قرار داده شدند. پس از ۴ هفته شاخص‌های طول شاخساره اصلی، وزن تر شاخساره و تعداد شاخساره یادداشت‌برداری شدند.

۲. تأثیر محیط‌کشت‌های مختلف بر رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

این آزمایش به‌منظور تعیین محیط‌کشت مناسب برای تولید و استقرار شاخساره انجام شد. سه نوع محیط‌کشت WPM، MS و MS با نصف غلظت عناصر ماکرو تیمارهای آزمایش بودند. همه تیمارها دارای ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، دو میلی‌گرم در لیتر BA، دو میلی‌گرم در لیتر GA₃ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز بودند و از ۸ گرم در لیتر دیفکو باکتو آگار برای نیمه جامد شدن محیط‌کشت استفاده گردید.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تکرار اجرا گردید و هر تکرار دارای ۴ ریزنمونه بود. پس از گندزدایی مواد گیاهی با کلراکس ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و سه بار آب‌شویی با آب مقطر سترون، ریزنمونه‌ها جدا و بر روی محیط‌کشت قرار داده و سپس به اتاق رشد منتقل شدند. پس از ۴ هفته از شاخص‌های رشد طول شاخساره اصلی، وزن تر شاخساره، تعداد شاخساره جانبی و وزن تر پینه (کالوس) یادداشت‌برداری صورت گرفت.

۳. تأثیر کربوهیدرات‌های مختلف در غلظت‌های متفاوت بر رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت آزمایش فاکتوریل در شش تکرار اجرا شد و هر تکرار دارای ۴ ریزنمونه بود. در این آزمایش کربوهیدرات‌های ساکارز، فروکتوز و گلوکز به‌عنوان فاکتور اول و غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر به‌عنوان فاکتور دوم مورد استفاده قرار گرفتند. از محیط‌کشت WPM

کربوهیدرات و مواد نیمه‌جامدکننده محیط‌کشت بر افزونش شاخساره در زیتون رقم دزفول بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه ریزازدیادی و کشت بافت گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ انجام شد. مواد گیاهی مورد نظر برای این پژوهش از شاخه‌های رشد فصل جاری درختان زیتون رقم دزفول ۲۵ ساله بارور از باغ بش متعلق به بنیاد مستضعفان و جانبازان واقع در نزدیکی شیراز تهیه شدند و از قطعات ساقه و نوک شاخساره آنها به‌عنوان ریزنمونه استفاده گردید.

گندزدایی پنس، اسکال‌پل، ظرف‌های شیشه‌ای، ظرف‌های کاشت و محیط‌کشت با استفاده از اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و فشار دو بار به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. ضدعفونی میز کار توسط الکل اتیلیک ۷۰ درصد صورت گرفت. پنس و اسکال‌پل در حین کار توسط Hot bead sterilizer به مدت یک دقیقه گندزدایی شدند.

برای گندزدایی مواد گیاهی ابتدا در آزمایشگاه، برگ‌های شاخه‌های رشد فصل جاری یا پاجوش‌ها حذف شدند، به‌طوری‌که تنها حدود ۰/۵ سانتیمتر از انتهای دم‌برگ بر روی ساقه باقی بماند. سپس شاخساره‌ها قطعه قطعه شدند و با آب جاری و چند قطره مایع ظرفشویی شسته و به‌منظور کاهش آلودگی قارچی، به مدت یک ساعت در محلول یک‌گرم در لیتر بنومیل قرار داده شدند. گندزدایی مواد گیاهی در زیر هود با جریان هوای یک‌طرفه سترون (هود لامینار) با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و محلول ۱۰ درصد کلراکس (سفیدکننده تجاری گلرنگ حاوی ۵ درصد کلر) انجام شد و بعد ۳ بار با آب مقطر سترون آبشویی شدند و در پایان ریزنمونه‌های مناسب از مواد گیاهی جدا و روی محیط‌کشت قرار داده شدند. ظرف‌های کشت مورد استفاده شامل لوله‌های آزمایش دهان‌گشاد، شیشه غذای بچه و مجنتا بودند. کشت‌ها در اتاق رشد با دمایی معادل 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد با طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و شدت نور ۷۵ میکرومول بر مترمربع در ثانیه که توسط لامپ‌های فلورسنت ایجاد می‌گردید، برای رشد قرار داده شدند. آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه SAS (SAS Institute, 1988) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

دارای ۶ تکرار بود که هر تکرار از ۴ ریزنمونه تشکیل شده بود. از قطعات ساقه رشد کرده درون شیشه دارای چندین جوانه جانبی به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. یادداشت‌برداری از شاخص‌های رشد پس از ۵ هفته صورت گرفت.

نتایج

۱. تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر تولید شاخساره درون

شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA طویل‌ترین شاخساره‌ها را تولید نمودند که به طور معنی‌دار از شاخساره‌های حاصل از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت‌های دارای ۰/۵ و یک میلی‌گرم در لیتر BA طویل‌تر بود لیکن با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار نداشت (جدول ۱).

دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA، ۲ میلی‌گرم در لیتر GA₃ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA و نیمه‌جامد شده با ۲/۴ گرم در لیتر فیتاژل استفاده گردید. از قطعات ساقه رشد کرده درون شیشه به طول ۴-۵ سانتیمتر دارای چندین جوانه جانبی و منشاء گرفته از درختان بالغ به‌عنوان ریزنمونه استفاده گردید. یادداشت‌برداری از شاخص‌های رشد پس از ۵ هفته صورت گرفت.

۴. تأثیر مواد نیمه‌جامدکننده محیط‌کشت بر تولید

شاخساره درون شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

این آزمایش به‌منظور تعیین ماده نیمه‌جامدکننده مناسب محیط کشت برای تولید و استقرار شاخساره صورت گرفت. از دیفکو باکتو آگار (۸ گرم در لیتر)، فیتاژل (۲/۴ گرم در لیتر) و آگار ژل (۴ گرم در لیتر) به‌عنوان تیمارهای آزمایش استفاده گردید. از محیط‌کشت WPM دارای ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر IBA، دو میلی‌گرم در لیتر BA، دو میلی‌گرم در لیتر GA₃ و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، در همه تیمارها استفاده گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا گردید و هر تیمار

جدول ۱: تأثیر غلظت‌های مختلف BA بر شاخص‌های رشد درون شیشه‌ای زیتون رقم دزفول[‡]

Table 1: The effects of different concentrations of BA on *In Vitro* growth indices of olive cv. Dezful[‡]

| تعداد شاخساره در ریزنمونه Number of Shoots per explant | وزن تر شاخساره در ریزنمونه (گرم) Shoot fresh weight per explant | طول شاخساره در ریزنمونه (سانتی‌متر) Shoot length per explant (cm) | غلظت BA (میلی‌گرم در لیتر) BA concentration (mg l ⁻¹) |
|---|---|--|---|
| 2.39c | 0.24c | 3.23b | 0.5 |
| 2.40c | 0.25c | 2.61c | 1.0 |
| 2.99b | 0.33b | 3.33ab | 1.5 |
| 3.48a | 0.45a | 3.58a | 2.0 |
| 2.48c | 0.33b | 3.33ab | 2.5 |

[‡] در هر ستون میانگین‌های که دارای حروف یکسانی هستند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر ندارند

[‡] In each column means followed by the same letters are not significantly different (P<1%) using DMRT

ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA بیشترین تعداد شاخساره در ریزنمونه را تولید کردند که به‌طور معنی‌دار از تعداد شاخساره‌های تولید شده در ریزنمونه بر روی سایر تیمارها بیشتر بود (جدول ۱).

بیشترین میانگین وزن تر شاخساره در هر ریزنمونه از کشت ریزنمونه‌ها بر روی محیط‌کشت دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA حاصل گردید که در مقایسه با ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های سایر تیمارها به‌طور معنی‌دار بیشتر بود (جدول ۱).

جدول ۲: تاثیر محیط کشت‌های مختلف بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول[‡]

Table 2: The effects of different nutrient media on *in vitro* growth indices of olive cv. Dezful[‡]

| وزن تر پینه در ریزنمونه (گرم) | تعداد شاخساره در ریزنمونه | طول شاخساره اصلی در ریزنمونه (سانتی‌متر) | وزن تر شاخساره در ریزنمونه (گرم) | محیط کشت |
|-------------------------------------|------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Callus fresh weight per explant (g) | Number of Shoots per explant | Main shoot length per explant (cm) | Shoot fresh weight per explants (g) | Nutrient medium |
| 0.5 a | 3.05 a | 3.37 a | 0.27 a | WPM |
| 0.60 a | 2.31 b | 2.56 b | 0.15 b | MS (half strength macronutrients) |
| 0.02 b | 1.70 c | 2.04 c | 0.13 b | MS |

[‡] در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

[‡] In each column means followed by the same letters are not significantly different ($P < 5\%$) using DMRT

جدول ۳: تأثیر کربوهیدرات‌های مختلف با غلظت‌های متفاوت بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول[‡]

Table 3: The effects of different carbohydrates with different concentrations on *In Vitro* growth indices of olive cv. Dezful[‡]

| طول شاخساره در ریزنمونه (سانتی‌متر) | وزن تر شاخساره در ریزنمونه (گرم) | تعداد شاخساره در ریزنمونه | منبع کربوهیدرات |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Main shoot length per explant (cm) | Shoot fresh weight per explants (g) | Number of Shoots per explant | Carbohydrate source |
| 3.80a | 0.27a | 2.15a | ساکارز |
| 2.53b | 0.23b | 1.88b | فروکتوز |
| 2.95a | 0.27a | 2.14a | گلوکز |
| | | | غلظت کربوهیدرات (گرم) |
| 3.05a | 0.27a | 2.26a | 30 |
| 2.47b | 0.24b | 1.86b | 40 |
| ** | ns | ns | اثر متقابل |
| | | | Interaction |

[‡] در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵٪ آزمون چنددامنه‌ای دانکن تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند

ns اثر متقابل منابع کربوهیدرات و غلظت‌های مختلف معنی‌دار نیست

** اثر متقابل منابع کربوهیدرات و غلظت‌های مختلف آنها در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود

[‡] In each column means followed by the same letters are not significantly different ($P < 5\%$) using DMRT
ns the interaction of carbohydrates and different concentrations of carbohydrate sources are not significantly different ($P < 5\%$)

** The interaction of carbohydrate sources and different concentrations of them are significantly different ($P < 1\%$)

ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت MS برتری داشتند (جدول ۲).

۳. تأثیر کربوهیدرات‌های مختلف با غلظت‌های

متفاوت بر رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

براساس نتایج حاصل از این آزمایش ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های دارای گلوکز و ساکارز از نظر کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده با یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند، اما هر دو نسبت به ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های دارای فروکتوز برتری معنی‌دار داشتند (جدول ۳).

ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌های کشت دارای ۳۰ گرم در لیتر کربوهیدرات از نظر کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مقایسه با ریز نمونه‌های کشت شده دارای ۴۰ گرم در لیتر کربوهیدرات به‌طور معنی‌دار برتری داشتند (جدول ۳). اثر متقابل کربوهیدرات‌های ساکارز، فروکتوز و گلوکز و غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم در لیتر بر طول شاخساره در ریز نمونه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

۲. تأثیر محیط‌کشت‌های مختلف بر رشد

درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، وزن‌تر شاخساره در ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت WPM به‌طور معنی‌دار در مقایسه با ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های MS و MS با نصف غلظت عناصر ماکرو بیشتر بود. تعداد شاخساره تولید شده و طول شاخساره اصلی در ریز نمونه نیز در ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت WPM در مقایسه با محیط‌کشت MS و MS با نیم غلظت عناصر ماکرو به‌طور معنی‌دار بیشتر بود (جدول ۲).

میزان وزن‌تر پینه تولید شده در ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو و محیط‌کشت WPM با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ولی هر دو در مقایسه با ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت MS به‌طور معنی‌دار وزن‌تر پینه بیشتری تولید کردند. براساس نتایج حاصل از این آزمایش ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو از نظر طول شاخساره و تعداد شاخساره در ریز نمونه به‌طور معنی‌دار بر

جدول ۴: تأثیر مواد نیمه جامدکننده محیط‌کشت بر شاخص‌های رشد درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول[‡]

Table 4: The effects of different gelling agents on the *in vitro* growth indices of olive cv. dezful[‡]

| وزن‌تر پینه در زیر نمونه (گرم) | طول شاخساره در زیر نمونه (سانتی‌متر) | تعداد شاخساره در زیر نمونه | وزن‌تر شاخساره در زیر نمونه (گرم) | مواد نیمه‌جامدکننده |
|------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Calus fresh weight per explant (g) | Shoot length per explant (cm) | Number of Shoots per explant | Shoot fresh weight per explant (g) | Gelling agent |
| 0.33 a | 3.89 a | 2.85 a | 0.34 a | فیتاژل Phytigel |
| 0.26 b | 2.99 b | 2.27 b | 0.29 b | آگارژل Agargel |
| 0.12 c | 2.5 b | 1.44 c | 0.17 c | دیفکوباکتو آگار Difco bacto agar |

[‡] در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۵٪ آزمون چند دامنه‌ای دانکن با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند

[‡] In each column means followed by the same letters are not significantly different ($P < 5\%$) using DMRT

معنی‌دار در کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده بهتر بود (جدول ۴).

ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های جامد شده با آگارژل در مقایسه با ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌های کشت نیمه‌جامد شده با دیفکو باکتو آگار نیز به‌طور معنی‌داری از نظر شاخص‌های رشد، وزن‌تر پینه، وزن‌تر شاخساره و تعداد شاخساره در ریز نمونه برتری داشتند (جدول ۴).

۴. تأثیر مواد نیمه جامدکننده محیط‌کشت بر تولید

شاخساره درون‌شیشه‌ای زیتون رقم دزفول

براساس نتایج حاصل از این آزمایش ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های نیمه‌جامد شده با فیتاژل در مقایسه با ریز نمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌های کشت نیمه‌جامد شده با آگارژل و دیفکو باکتو آگار به‌طور

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق تاثیر غلظت‌های مختلف BA به‌عنوان سایتوکاینین برای افزونش شاخساره مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که غلظت دو میلی‌گرم در لیتر BA در شاخص‌های مورد ارزیابی در مقایسه با سایر غلظت‌های BA برتری داشت (جدول ۱) و با نتایج تحقیقات اسقیر و همکاران (2005) و رستمی و شهسوار (2012) مطابقت دارد. آنتونوپولو و همکاران (2012) استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر IBA برای استقرار و افزونش شاخساره زیتون رقم Chondrolia Chalkidikis را گزارش کرده‌اند که با نتایج این پژوهش متفاوت است. به نظر می‌رسد این اختلاف احتمالاً به ساختار ژنتیکی رقم‌های مورد مطالعه بستگی داشته باشد. کیفیت شاخساره‌های تولید شده بسته به غلظت BA در محیط‌کشت تفاوت نشان داد و معمولاً در غلظت‌های کم BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) برگ‌های شاخساره‌ها درشت‌تر و شاداب‌تر بودند ولی تعداد شاخساره‌های تولید شده کمتر بود (جدول ۱). در محیط کشت‌های دارای ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به غلظت‌های بیشتر آن، میانگین طول شاخساره تولید شده بیشتر و این امر تأثیر سایتوکاینین‌ها در از بین بردن چیرگی انتهایی ساقه را نشان می‌دهد، که در غلظت‌های زیادتر BA رشد طولی ساقه کاهش یافت (جدول ۱).

براساس نتایج حاصل از این پژوهش مشخص گردید ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت WPM به‌طور معنی‌دار از نظر شاخص‌های رشد وزن تر شاخساره، طول شاخساره اصلی و تعداد شاخساره اصلی در ریزنمونه در مقایسه با ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت‌های MS و MS با نصف غلظت عناصر ماکرو برتری دارند و با نتایج تحقیقات انجام شده توسط گریگوریا دو و همکاران (2003)، که محیط کشت WPM را به‌عنوان بهترین محیط‌کشت گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد (جدول ۲). همچنین شاخص‌های رشد ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت MS با نصف غلظت عناصر ماکرو به‌طور معنی‌دار بر ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت MS برتری داشتند (جدول ۲) و با یافته‌های برهد / و همکاران (2003) که برتری محیط‌کشت MS نیم‌غلظت نسبت به محیط‌کشت‌های OM و MS را گزارش نموده‌اند در تناقض می‌باشد. تفاوت در ساختار ژنتیکی رقم‌های مورد مطالعه و سایتوکاینین مورد استفاده (زاتین) احتمالاً دلیل این تفاوت می‌باشد. نخستین بار راجینی (۱۹۸۴) محیط‌کشت

اختصاصی زیتون (OM) را گزارش و تعدادی از پژوهشگران مناسب بودن آن را برای تولید شاخساره در چندین رقم زیتون گزارش نموده‌اند (آنتونوپولو و همکاران، 2012؛ برهد / و همکاران، 2003؛ گارسیا فریز و همکاران، 2002). به‌نظر می‌رسد، زیتون برای رشد درون‌شیشه‌ای به محیط‌کشت‌های با غلظت نمک پایین نیاز دارد و محیط‌کشت‌های WPM و MS با نصف غلظت عناصر ماکرو برای آن مناسب است، در حالی که محیط کشت MS کامل که در آن غلظت نمک‌ها بیشتر است رشد مناسبی ندارد. نامناسب بودن محیط‌کشت MS برای کشت درون شیشه‌ای زیتون توسط آنتونوپولو و همکاران (2012) نیز گزارش شده است.

استفاده از ساکارز و گلوکز به‌عنوان منبع کربوهیدرات در زیتون رقم دزفول نسبت به فروکتوز در کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده، برتری معنی دار نشان داد که با گزارش شیپلی و همکاران (2001) مطابقت دارد (جدول ۳). محیط‌کشت‌های دارای ۳۰ گرم در لیتر کربوهیدرات از نظر کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مقایسه با محیط‌های دارای ۴۰ گرم در لیتر کربوهیدرات برتری داشتند و شاخساره‌های تولید شده از نظر ساختار ظاهری نیز وضعیت مطلوبی داشتند. بیشتر پژوهشگران از ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در کشت‌های درون شیشه‌ای زیتون استفاده کردند (اسقیر و همکاران، ۲۰۰۲، رستمی و شهسوار، ۲۰۱۲، گارسیا فریز و همکاران، ۲۰۰۲) مطلوب بودن غلظت ۳۴ گرم در لیتر ساکارز یا مانیتول برای کشت درون شیشه‌ای زیتون رقم Maurino توسط لو / و همکاران (1994) نیز گزارش شده است.

براساس نتایج حاصل از این پژوهش استفاده از ماده ژله‌ای کننده فیتاژل در کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مقایسه با مواد ژله‌ای کننده آگارژل و دیفکو باکتو آگار برتری معنی‌دار نشان داد (جدول ۴). در منابع علمی گزارشی در مورد مقایسه فیتاژل، آگارژل و دیفکو باکتو آگار در کشت‌های درون‌شیشه‌ای زیتون یافت نشد و بیشتر پژوهشگران از ۸ گرم در لیتر آگار برای نیمه‌جامد نمودن محیط‌کشت استفاده کرده‌اند (رستمی و شهسوار، ۲۰۱۲، گارسیا فریز و همکاران، ۲۰۰۲، چری و همکاران، ۲۰۰۲). استفاده از فیتاژل به‌عنوان ماده ژله‌ای کننده محیط‌کشت نسبت به دیفکو باکتو آگار برتری‌هایی دارد. نخست این‌که محیط‌کشت نیمه‌جامد شده با فیتاژل شفاف است و در آزمایش‌هایی که ریزنمونه‌ها از درختان بالغ تهیه می‌شوند و دارای آلودگی باکتریایی هستند تشخیص نمونه‌های بدون آلودگی راحت‌تر است. همچنین کیفیت شاخساره‌های تولید شده بر روی محیط‌کشت‌های نیمه‌جامد شده با فیتاژل

سایتوکاینین‌ها و اسیدجیبرلیک (اسقیر و همکاران، 2002؛ رستمی و شهسوار، 2012؛ گارسیا فریز و همکاران، 2002)، نوع محیط‌کشت (آنتونوپولو و همکاران، 2012؛ سن‌تو و همکاران، 2002؛ گریگوریا دو و همکاران، 2003) و منبع کربوهیدرات (چری و همکاران، 2002؛ شیبلی و همکاران، 2001؛ لوا و همکاران، 1994) دارد. به‌طورکلی استفاده از قطعه‌های ساقه دارای چند جوانه جانبی گرفته‌شده از شاخه‌های رشد فصل جاری به‌عنوان ریزنمونه و محیط‌کشت WPM دارای دو میلی‌گرم در لیتر BA، ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و نیمه جامد شده با ۲/۴ گرم در لیتر فیتاژل به‌عنوان بهترین ترکیب محیط‌کشت برای تولید درون‌شیشه‌ای شاخساره در زیتون رقم دزفول توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از مسئول محترم بنیاد مستضعفان و جانبازان استان فارس که ما را در تهیه مواد گیاهی یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌گردد.

بهرتر است. برتری فیتاژل نسبت به دیفکو باکتو آگار احتمالاً به‌دلیل خالص‌تر بودن فیتاژل می‌باشد. سعادت و هنریتی (Saadat and Hennerty, 2002) و سعادت و همکاران (Saadat *et al.*, 2012) برتری معنی‌دار فیتاژل را نسبت به دیفکو باکتو آگار به‌عنوان ماده جامدکننده محیط‌کشت در شاخساره‌های رشد درون شیشه‌ای گردو و *Pyrus glabra* Boiss. گزارش نموده‌اند. باریس و همکاران (Barbas *et al.*, 1993) گزارش کرده‌اند که محیط‌کشت نیمه‌جامد شده با آگار سه برابر محیط‌کشت نیمه‌جامد شده با فیتاژل سدیم دارد و برگ شاخساره‌های گردوی رشد کرده بر روی محیط‌کشت نیمه‌جامد شده با آگار به‌طور معنی‌دار، دارای سدیم بیشتری بودند. همچنین نایرن و همکاران (Nairn *et al.*, 1995) گزارش کرده‌اند که ریزنمونه‌های کشت شده *Pinus radiata* بر روی محیط‌کشت نیمه جامد شده با دیفکو باکتو آگار دارای رشد ضعیف بودند و علامت سمیت را نشان دادند در حالی که ریزنمونه‌های کشت شده بر روی محیط‌کشت نیمه جامد شده با فیتاژل دارای چنین علایمی نبودند.

در حقیقت افزونش شاخساره در زیتون براساس نتایج این پژوهش و گزارش‌های سایر پژوهشگران بستگی به رقم/اسقیر و همکاران (2005)، نوع و غلظت سایتوکاینین و یا ترکیبی از

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۸-۱۹ متن انگلیسی مراجعه شود.