Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ شماره چهارم ـ مهر ـ آبان ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

استقرار درون شیشه‌ای سه رقم زیتون (*Olea europaea* L.)

مهناز کیانی فریز[۱]، ذبیح‌ا... زمانی[۲] و علی عبادی[۲]

[۱]دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، [۲]گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۲/۵/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۹/۹

چکیده

سیستم‌های کشت بافت گیاهی دارای کارآیی بالایی در مواردی مانند ازدیاد انبوه گیاهان عاری از بیماری و همچنین اصلاح ژنتیکی هستند. با توجه به این موارد و اهمیت محصول زیتون آزمایش‌هایی جهت بررسی استقرار درون شیشه‌ای سه رقم زیتون انجام شد. به این منظور، ریزنمونه‌های تک گره از گیاهان بالغ گلدانی ارقام زرد، دزفول و مانزانیلا گرفته شدند. برای تشخیص بهترین تیمار ضدعفونی غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم و کلریدجیوه مورد آزمون قرار گرفتند. جهت بهینه‌سازی استقرار شاخساره‌ها نیز سه زمان نمونه‌گیری (نیمه ماه‌های بهمن، اردیبهشت و مرداد) و سه محیط کشت OM، MS و MS با نصف غلظت عناصر پرمصرف (۱/۲MS) مقایسه شدند. عامل عمده آلودگی نمونه‌ها و اثر کنترل‌کننده آنتی بیوتیک سفوتاکسیم بررسی شد. همچنین تأثیر دو نوع سایتوکاینین بنزیل‌آدنین و زآتین در استقرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. براساس نتایج، مناسب‌ترین تیمار ضدعفونی عبارت از تیمار ریزنمونه‌ها با محلول ۰/۱ درصد کلرید جیوه به‌مدت ۳ دقیقه و ۳ مرتبه آبشویی با آب مقطر استریل بود. بهترین نتایج استقرار با استفاده از ریزنمونه‌های گرفته شده در نیمه مرداد و در محیط ۱/۲MS به‌دست آمد. عامل عمده آلودگی، باکتری *Pseudomonas* تشخیص داده شد و کنترل بهتر آلودگی با استفاده از آنتی بیوتیک سفوتاکسیم به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میسر گردید. اضافه کردن بنزیل آدنین به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت ۱/۲MS باعث بهبود استقرار ریزنمونه‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: ریزازدیادی، استقرار و زیتون

مقدمه

زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. درختی همیشه سبز با عمر طولانی از تیره *Oleaceae* است که ۹۳ درصد از تولید جهانی آن برای استحصال روغن بکار برده می‌شود. درخت زیتون طالب شرایط اقلیمی مدیترانه‌ای است اما به‌دلیل کم توقعی به نهاده‌های کشاورزی و توانایی سازگاری بالا به شرایط نامساعد، این قابلیت مهم را دارد که عرصه‌های وسیعی از اراضی کم بازده را که در آنها محصول دیگری امکان تولید اقتصادی ندارد، به خود اختصاص دهد (میرمنصوری، ۱۳۷٤؛ لازمی‌زاده، ۱۳۷۸).

روش‌های کشت درون‌شیشه‌ای با توجه به توانایی‌هایی 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 تا کنون با استفاده از روش‌های سنتی پیشرفت قابل توجهی نداشته است، باشد (کاناس و همکاران، ۱۹۹۲؛ فونتانازا و همکاران، ۱۹۹۹ و روگینی و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران، ۱۹۹۹). ریزازدیادی یک روش نسبتاً جدید برای ازدیاد زیتون است که هنوز جایگزین سیستم‌های متداول تکثیر نشده است و کاربرد آن در سطح وسیع نیاز به بهینه‌سازی دستورالعمل‌ها و سازگار نمودن آنها با نیازهای خاص ارقام مختلف زیتون دارد (زوکچرلی و زوکچرلی، ۲۰۰۲). محققین جهت استقرار کشت‌ها و پرآوری شاخساره‌های جانبی استفاده از ریزنمونه تک‌گره از شاخساره‌های نازک انتهایی زیتون را توصیه نموده‌اند، اما آلودگی‌های درونی موجب مشکلاتی در به‌دست آوردن ریزنمونه‌های عاری از آلودگی است (روگینی و فدلی، ۱۹۹۰؛ کاناس و همکاران، ۱۹۹۲؛ روگینی و همکاران، ۱۹۹۹).

در مرحله استقرار ریزنمونه‌های زیتون استفاده از محیط‌های کشت مختلف از جمله محیط OM[1] (روگینی، ۱۹۸٤)، محیط WPM[2] (دایماسی، ۱۹۹٤) و محیط حاوی یک دوم عناصر پرمصرف MS[3] (روگینی و کاریکاتو، ۱۹۹۵) با غلظت پایین سایتوکاینین‌ها بویژه زآتین[4] به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توصیه شده است (روگینی، ۱۹۸٦). از جمله راه‌کارهای پیشنهادی برای کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های زیتون که از مشکلات عمده ریزازدیادی آن می‌باشد، به مواردی از جمله تهیه ریزنمونه در زمان بخصوصی از سال (سیهان و اوزامباک، ۱۹۹٤)، تیمارهای ضداکسیدانی (دایماسی، ۱۹۹٤)، قراردادن ریزنمونه‌ها در آب مقطر استریل قبل از کشت (سیهان و اوزامباک، ۱۹۹٤) و نیز اضافه کردن ترکیبات آلی نیتروژنی به محیط کشت (بونگا و ون آدرکاس، ۱۹۹۲) اشاره شده است. در خصوص استقرار درون‌شیشه‌ای ارقام زیتون ایرانی با استفاده از ریزنمونه‌های برگرفته از بافت‌های نونهال و بالغ گزارش‌های منتشر شده معدودی وجود دارد (داداشیان، ۱۳۷۵؛ خوشکام، ۱۳۷۸). از آنجایی که آلودگی‌های درونی و قهوه‌ای شدن بافت‌های ریزنمونه‌های بالغ زیتون یکی از موانع اصلی برای کاربرد آنها در کشت بافت بوده است، تحقیق حاضر به‌منظور بررسی این عوامل و روش‌های فائق آمدن بر آنها صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

گیاهان گلدانی ارقام زرد، دزفول و مانزانیلا[5] که در گلدان‌های ۵ لیتری پلی‌اتیلن حاوی مخلوطی از ماسه، خاکبرگ و خاک سطح‌الارض به نسبت ۱:۱:۱ کاشته شده بودند، برای تهیه ریزنمونه مورد استفاده قرار گرفتند. این گیاهان ضمن نگهداری در گلخانه با کود مایع زربار به نسبت ٤ در هزار به‌طور هفتگی تغذیه و به‌منظور کاهش و پیشگیری از آلودگی‌ها با سموم بنومیل به نسبت ۱/۵ در هزار و اکسی‌کلرورمس به نسبت ۲ در هزار هر دو هفته یکبار سمپاشی می‌شدند. شاخه‌های حاصل از رشد جدید به طول ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر جدا شده و به‌عنوان منبع ریزنمونه مورد استفاده قرارگرفتند.

به‌منظور کاهش آلودگی‌های سطحی، شاخه‌ها ابتدا با آب شسته شده سپس با آب و مایع ظرفشویی به دقت برس‌کشی و پس از شستشوی مجدد به‌مدت یک ساعت در زیر آب جاری قرارگرفتند. پس از حذف برگ‌ها، شاخه‌ها به قطعات حاوی چند گره تقسیم و جهت اعمال تیمارهای ضدعفونی بکاربرده شدند.

به‌دلیل محدود بودن گیاهان مادری جهت گرفتن ریزنمونه، آزمایش‌های ضدعفونی با استفاده از ریزنمونه‌های رقم مانزانیلا که به تعداد بیشتری در دسترس بود، انجام گردید و از نتایج آن جهت ضدعفونی سایر ریزنمونه‌ها استفاده شد. در اولین آزمایش ضدعفونی پس از غوطه‌ورکردن نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد حجمی، هشت تیمار ضدعفونی شامل ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه هر کدام در دو زمان ۳ و ٦ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱ و ۲/۵ درصد ماده فعال در دو زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه اعمال شد و سپس نمونه‌ها سه

1-Olive medium
2-Woody Plant Medium
3-Murashige and Skoog
4-Zeatin

5-Manzanilla

www.SID.ir

Archive of SID

مرتبه با آب مقطر استریل در فواصل زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه آبشویی شدند و به قطعات تک‌گره به طول ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر تقسیم و در داخل ظروف کشت شیشه‌ای با درپوش نیمه‌شفاف قابل اتوکلاو حاوی ۳۵ تا ۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت MS به‌علاوه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA کشت شدند.

در دومین آزمایش ضدعفونی، با توجه به نتایج آزمایش اول، پنج تیمار ضدعفونی طرح‌ریزی و اعمال گردید که شامل ۰/۱ درصد کلرید جیوه به‌مدت ۳ دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ماده فعال به‌مدت ۱۵ دقیقه و تیمار ترکیبی کلرید جیوه ۰/۰۵ درصد به‌علاوه هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ماده فعال به‌مدت ۳ دقیقه بودند. با هدف کاهش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در دو تیمار اول، شستشوی ریزنمونه‌ها با آب مقطر حاوی ۲ درصد اسید سیتریک بعد از ضدعفونی، با شستشوی ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل مقایسه شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام و هر واحد آزمایشی شامل ۳ شیشه و هر شیشه حاوی ۳ ریزنمونه بود. در این آزمایش‌ها تعداد ریزنمونه‌های آلوده، قهوه‌ای شده و ریزنمونه‌هایی که آغاز رشد جوانه‌های جانبی در آنها مشاهده شد، ثبت و درصد استقرار محاسبه گردید. بعد از انتخاب تیمار ضدعفونی بهینه، آزمایش‌های استقرار ریزنمونه‌های زیتون سه رقم زرد، دزفول و مانزانیلا در سه زمان (نیمه ماه‌های بهمن، اردیبهشت و مرداد) و در سه محیط‌کشت OM، MS و MS با نصف غلظت عناصر پرمصرف (۱/۲MS) به‌علاوه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی اجرا و شیشه‌های کوچک مکارتی که هر یک حاوی یک ریزنمونه بود به‌عنوان یک تکرار و ۵۰ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. به‌منظور تشخیص عوامل آلودگی نمونه‌هایی به آزمایشگاه باکتری‌شناسی گروه گیاهپزشکی فرستاده شد. با توجه به نتایج آزمون‌های تشخیصی، اضافه نمودن آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم[1] که یک بازدارنده سنتز دیواره سلولی باکتری است و تأثیر بالایی روی باکتری‌های گرم منفی دارد، در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت ۱/۲MS در کنار تیمار بدون آنتی‌بیوتیک به‌عنوان شاهد مورد آزمون قرار گرفت. جهت بهینه‌سازی استقرار درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌ها، آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با ۲۵ تکرار، جهت مقایسه اثر دو نوع سایتوکاینین، زآتین و بنزیل آدنین[2] هر یک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر، در محیط ۱/۲MS انجام شد.

نتایج

در مقایسه درصد آلودگی ریزنمونه‌ها با هشت تیمار ضدعفونی، تفاوت معنی‌داری بین تیمار کلرید جیوه ۰/۲ درصد، در مدت ۳ و ٦ دقیقه با تیمارهای هیپوکلریت سدیم مشاهده شد (جدول ۱). کمترین درصد قهوه‌ای شدن در تیمار ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به‌دست آمد که تفاوت معنی‌داری با شش تیمار دیگر ضدعفونی نشان داد. ریزنمونه‌ها در تیمارهای ۰/۲ درصد کلریدجیوه بیشترین میزان قهوه‌ای شدن را نشان دادند که تفاوت آن با تیمارهای ۰/۱ درصد کلریدجیوه معنی‌دار بود. در این آزمایش کمترین درصد استقرار در ریزنمونه‌های تیمارشده با کلریدجیوه ۰/۲ درصد به‌دست آمد که تفاوت آنها با کلریدجیوه ۰/۱ درصد و هیپوکلریت سدیم ۱ درصد معنی‌دار بود ولی با تیمار ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

در دومین آزمایش ضدعفونی، کمترین درصد آلودگی و بیشترین درصد استقرار در تیمار کلریدجیوه ۰/۱ درصد و مدت زمان ۳ دقیقه مشاهده شد که تفاوت آن با تیمار هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و تیمار ترکیبی شامل کلریدجیوه ۰/۰۵ درصد و هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ۳ دقیقه از نظر آماری معنی‌دار بود و برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شد. شستشوی ریزنمونه‌ها با

1-Cefotaxime
2-Benzyladenine, BA

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدسیتریک تأثیر معنی‌داری بر کاهش درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها نداشت (جدول ۲).

نتایج بررسی اثر زمان نمونه‌گیری برروی استقرار ریزنمونه‌ها، کمترین درصد آلودگی را در ریزنمونه‌های گرفته شده در نیمه مرداد نشان داد و در بین سه رقم نیز ریزنمونه‌های رقم مانزانیلا کمترین درصد آلودگی را داشتند (شکل ۱). بیشترین درصد استقرار و کمترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها از نظر زمان نمونه‌گیری در نیمه مرداد (شکل ۲) و کمترین درصد قهوه‌ای شدن آنها در محیط‌کشت MS۱/۲ به‌دست آمد (شکل ۳). ریزنمونه‌های هر سه رقم بهترین پاسخ را از نظر درصد استقرار در محیط‌کشت MS۱/۲ نشان دادند (شکل ٤).

جدول ۱- مقایسه درصد آلودگی، قهوه‌ای شدن و استقرار ریزنمونه‌های زیتون (رقم مانزانیلا) در روش‌های مختلف ضدعفونی (آزمایش اول).

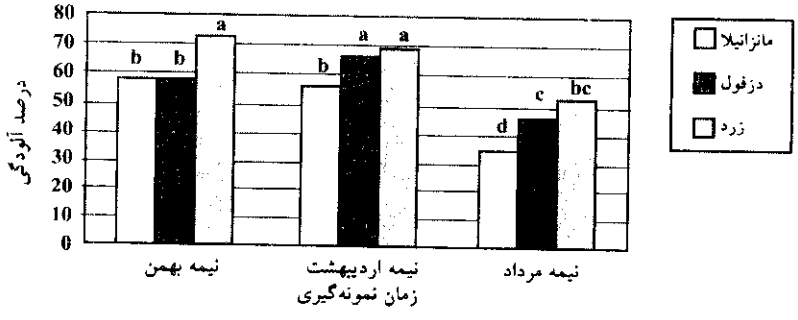
تیمار ضدعفونی	درصد آلودگی	درصد قهوه‌ای شدن	درصد استقرار
۰/۱٪ کلرید جیوه، ۳ دقیقه	٤۳/۰۵b	٤۱/۷۵ab	۱۹a
۰/۱٪ کلرید جیوه، ٦ دقیقه	٤۰b	٤۵ab	۱۸a
۰/۲٪ کلرید جیوه، ۳ دقیقه	٦۲/٤a	۲۵/۱۹b	٦/٦٦b
۰/۲٪ کلرید جیوه، ٦ دقیقه	٦۲/۲a	۲۳/۷b	۵/٦٦b
۱٪ هیپوکلریت سدیم، ۱۰ دقیقه	۱۵/۷٦c	٦٦/۳٤a	۱۵a
۱٪ هیپوکلریت سدیم، ۱۵ دقیقه	۱۳/۸c	٦۲/۲۸a	۱۵a
۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم، ۱۰ دقیقه	۳۸/۰۳b	۵۵/۹٤a	۱۳ab
۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم، ۱۵ دقیقه	۳۷/۸۳b	۵۳/۲٦a	۱۲ab

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسانی می‌باشند، با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد آلودگی، قهوه‌ای شدن و استقرار ریزنمونه‌های زیتون (رقم مانزانیلا) در روش‌های مختلف ضدعفونی (آزمایش دوم).

تیمار ضدعفونی	درصدآلودگی	درصد قهوه ای شدن	درصد استقرار
۰/۱٪ کلرید جیوه، ۳ دقیقه	۳٤/۰۸b	٤۰/۷٤a	۲٤/۳۳a
۰/۱٪ کلرید جیوه، ۳ دقیقه، ۲٪ اسیدسیتریک	۳۵/۰۵b	۳۹/۵۹a	۲۲/۸۳a
۱٪ هیپوکلریت سدیم، ۱۵ دقیقه	۵٤/۹۳a	۱۹/۹۳b	۱۸/۲۷b
۱٪ هیپوکلریت سدیم، ۱۵ دقیقه، ۲٪ اسیدسیتریک	۵۵/۹۳a	۱۸/۷٤b	۱۷/۷b
۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم + ۰/۰۵٪ کلرید جیوه، ۳ دقیقه	۵۰/۱۹a	۵۰a	۹/۹c

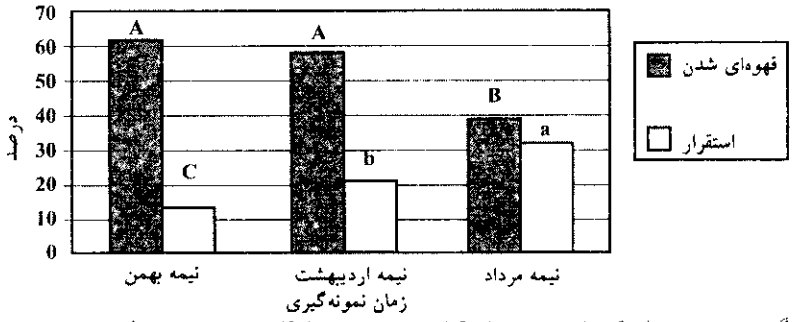
در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف یکسانی می‌باشند، با استفاده از آزمون LSD در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.



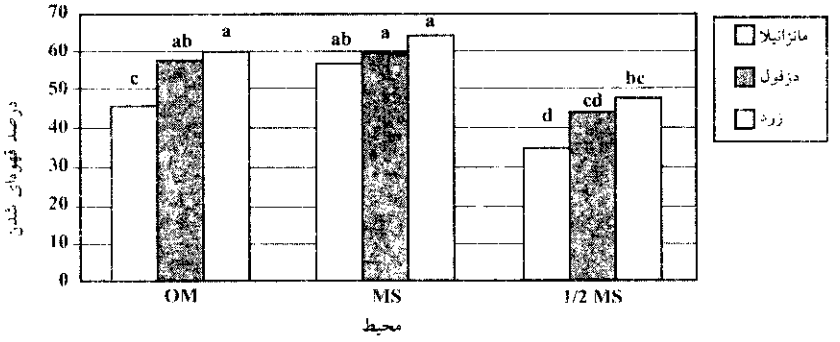
شکل ۱- اثر زمان نمونه‌گیری برروی میزان آلودگی سه رقم زیتون در شرایط درون شیشه‌ای. ستون‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون LSD).

www.SID.ir

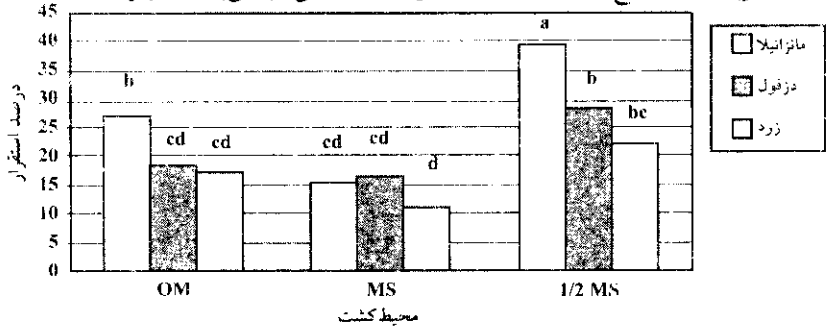
Archive of SID



شکل ۲- اثر زمان نمونه‌گیری برروی میزان قهوه‌ای شدن و استقرار ریزنمونه‌های ارقام زیتون در شرایط درون‌شیشه‌ای ستونهایی که دارای حرف مشترک می‌باشند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون LSD).



شکل ۳- اثر محیط‌های کشت بر میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌های سه رقم زیتون در شرایط درون‌شیشه‌ای ستونهایی که دارای حرف مشترک می‌باشند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون LSD).

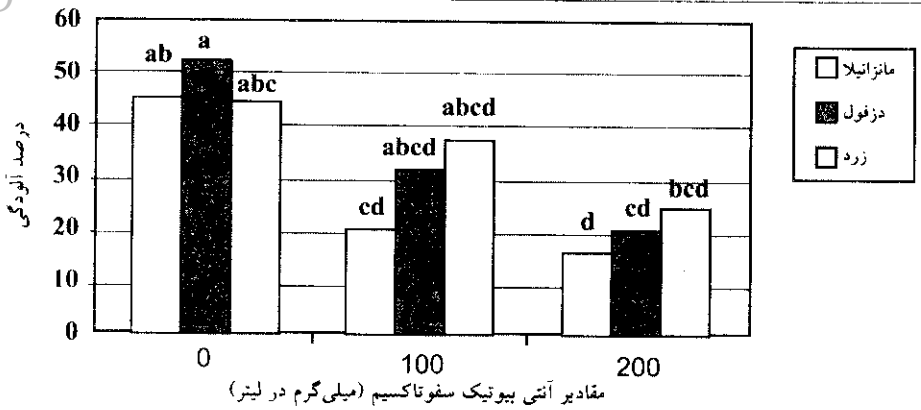


شکل ٤- اثر محیط‌های کشت برروی استقرار درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های سه رقم زیتون ستونهایی که دارای حرف مشترک می‌باشند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون LSD).

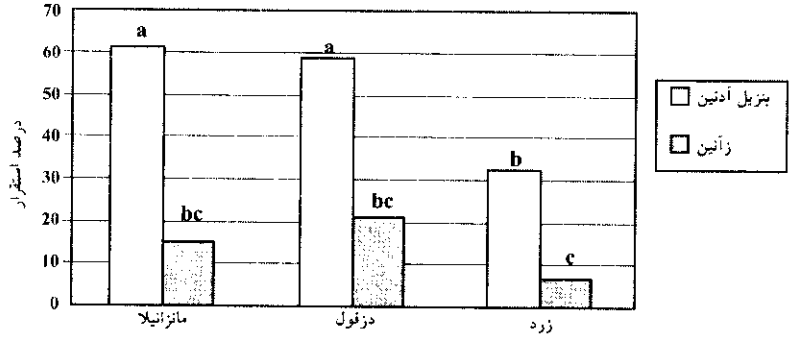
با توجه به بررسی‌هایی که برای شناسایی عوامل آلودگی انجام گرفت، آلودگی از نوع باکتریایی و از جنس *Pseudomonas* تشخیص داده شد. بیماریزا بودن گونه‌های مختلف این باکتری روی گیاهان به اثبات رسیده است و دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و خسارت‌های فراوانی ایجاد می‌کند، (میرمنصوری، ۱۳۷٤). استفاده از تیمارهای سفوتاکسیم نشان داد که این آنتی‌بیوتیک می‌تواند تا حد قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش درصد آلودگی ریزنمونه‌ها شود، بطوریکه تفاوت معنی‌داری بین درصد آلودگی تیمار شاهد با تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم مشاهده شد. ارقام نیز تفاوت‌هایی در پاسخ به تیمارهای سفوتاکسیم نشان دادند، بطوریکه رقم مانزانیلا، کمترین میزان آلودگی را در مقایسه با دو رقم دیگر داشت (شکل ۵). در ارزیابی درصد رشد ریزنمونه‌ها در تیمارهای آنتی‌بیوتیک، تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار صفر (٤۸ درصد) و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۵۸ درصد) با تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۳۵ درصد) مشاهده شد. ریزنمونه‌های سه رقم مورد آزمایش، در محیط پایه ۱/۲MS پاسخ رشدی مطلوب‌تری را از نظر درصد ریزنمونه‌های رشد یافته با کاربرد ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA نسبت به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر زآتین نشان دادند و در هر سه رقم تفاوت معنی‌داری بین این دو تیمار مشاهده شد (شکل ٦).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- تأثیر تیمار آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم بر روی کاهش میزان آلودگی ریزنمونه‌های سه رقم زیتون در شرایط درون‌شیشه‌ای. ستون‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون LSD).



شکل۶- اثر سایتوکاینین‌های بنزیل آدنین و زآتین هر کدام به میزان ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر بر درصد استقرار ریزنمونه‌های ارقام زیتون. ستون‌هایی که دارای حرف مشترک می‌باشند در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند (آزمون LSD).

بحث

از دست رفتن تعداد قابل توجهی از ریزنمونه‌ها در مراحل اولیه کشت درون‌شیشه‌ای، بخصوص به‌دلیل آلودگی، مشکلی است که بیشتر در گونه‌های چوبی رخ می‌دهد (اوترو و دوکامپو، ۱۹۹۸). در رابطه با ریزازدیادی زیتون نیز به‌دست آوردن ریزنمونه‌های بدون آلودگی به‌عنوان یکی از مشکلات اصلی مطرح شده است (کاناس و همکاران، ۱۹۹۲؛ روگینی و فدلی، ۱۹۹۰؛ روگینی و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین بروز درصد نسبتاً بالای آلودگی دور از انتظار نبود. با وجود این، با انجام دو آزمایش ضدعفونی کنترل بخشی از آلودگی‌ها با استفاده از تیمار ۰/۱ درصد کلریدجیوه میسر گردید.

براساس نتایج آزمایش‌های زمان نمونه‌گیری، نیمه مرداد به‌عنوان بهترین زمان برای سه رقم مورد آزمایش انتخاب شد که با دوره رشد فعال درخت زیتون مطابقت دارد. از دلایل پاسخ بهتر ریزنمونه‌ها در این زمان می‌تواند درصد کمتر آلودگی و قهوه‌ای شدن باشد. قهوه‌ای شدن در طی دوره خواب و رشد کند گیاه با سرعت و میزان بیشتری رخ می‌دهد (رید و همکاران، ۱۹۹۸). بهترین زمان گرفتن ریزنمونه از نظر حداکثر سرعت رشد و حداقل ترشح مواد فنلی برای دو رقم زیتون ممسیک[1] و دومات[2] نیز تابستان گزارش شده است (سیهان و اوزامباک، ۱۹۹٤). تغییر میزان هورمون‌های بافت‌ها نیز می‌تواند یکی از دلایل مشاهده پاسخ‌های متفاوت ریزنمونه‌ها در فصول مختلف باشد. مطالعات انجام شده برروی میزان سایتوکاینین‌های آزاد نوک شاخساره زیتون نشان داد که مقدار آنها به‌طور معنی‌داری با فصل تغییر می‌نمود، بطوریکه در زمستان قابل ردیابی نبود، اما در نیمه اردیبهشت افزایش تدریجی آنها در بخش‌های مختلف نوک شاخساره مشخص گردید (چریکوئی و همکاران،

1-Memecik
2-Domat

www.SID.ir

Archive of SID

۱۹۹۹). مهمترین دلیل برتری محیط‌کشت ۱/۲MS در استقرار ریزنمونه‌های زیتون را باید در قدرت یونی کمتر آن در مقایسه با دو محیط‌کشت دیگر دانست. قدرت یونی محیط MS با نصف غلظت عناصر پرمصرف برابر با ٤٦/٥ میلی مولار و قدرت یونی محیط‌های OM و MS به‌ترتیب برابر با ٦٨ و ۹۳ میلی‌مولار می‌باشد. هرچه غلظت نمک‌ها در محیط‌کشت کمتر باشد، به علت کاهش پتانسیل اسمزی محیط‌کشت، امکان جذب آب و مواد غذایی بیشتری برای ریزنمونه‌ها فراهم می‌شود. جذب آب، حفظ حالت تورژسانس سلول‌ها را ممکن می‌سازد و از این طریق به رشد آنها کمک می‌کند. همچنین درصد کمتر قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در محیط ۱/۲MS در ارتباط با غلظت پائین‌تر نمک‌ها در این محیط می‌باشد، به‌دلیل اینکه غلظت بالای نمک‌ها باعث افزایش تولید ترکیب‌های فنلی و در نتیجه افزایش قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها می‌شود (سنویرانته و ویجسرکارا، ۱۹۹٦). محیط ۱/۲MS برای مراحل اولیه کشت درون‌شیشه‌ای رقم پیکولین نیز مطلوب گزارش شده است (برهادا و همکاران، ۲۰۰۳). با توجه به نتایج شناسایی عوامل آلودگی ثابت شد که یکی از دلایل درصد نسبتاً بالای آلودگی ریزنمونه‌ها حتی پس از تیمارهای ضدعفونی، درونی بودن عوامل آلودگی بوده است، اگرچه گیاهان مادری که به‌عنوان منبع ریزنمونه بکار برده شدند علائم بیماری را نشان نمی‌دادند. بنابراین ممکن است که جمعیت باکتری در حدی باشد که امکان زنده ماندن گیاهان وجود داشته ولی برای نشان دادن علائم بیماری جمعیت آنها به اندازه کافی نباشد. محققین دیگر نیز توانستند از برگ‌های زیتون که علائم بیماری را نشان نمی‌دادند، باکتری *P. Savastanoi* را جدا کنند (ارکولانی، ۱۹۷۲؛ سوریکو، ۱۹۸٦). همچنین نیمه مرداد که به‌عنوان بهترین زمان نمونه‌گیری مشخص شد، منطبق با دوره فعالیت کم باکتری‌های جنس سودوموناس می‌باشد. به این ترتیب نتایج آزمایش‌های بررسی اثر زمان نمونه‌گیری بر استقرار ریزنمونه‌های زیتون می‌تواند مرتبط با میزان فعالیت باکتری‌ها باشد. در بررسی اثر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم در کنترل آلودگی‌ها، با توجه به اینکه کاهش میزان آلودگی در دو رقم مانزانیلا و دزفول مشاهده شد و کنترل کامل حاصل نگردید، می توان نتیجه‌گیری کرد که به‌دلیل استفاده از یک نوع آنتی‌بیوتیک، تنها کنترل انواع خاصی از عوامل آلودگی که به احتمال زیاد باکتری‌های جنس سودوموناس بوده است، فراهم شده است. به همین دلیل در برخی موارد از تیمارهای ترکیبی آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود تا دامنه تأثیر آنها برروی عوامل آلودگی بیشتر شود (رید و همکاران، ۱۹۹۸؛ سینگ و همکاران، ۱۹۹۹).

نتیجه اثر سایتوکنین‌ها در مرحله استقرار با نتیجه‌ای که پیش‌بینی شد، متفاوت بود زیرا گزارش‌ها حاکی از پاسخ بهتر ریزنمونه‌های تک گره زیتون با استفاده از زآتین بوده است (روگینی، ۱۹۸٦ و اوترو و دوکامپو، ۱۹۹۸). مشاهده چنین پاسخی ممکن است به کیفیت زآتین بکاربرده شده نیز مربوط باشد.

نتیجه‌گیری

دو مشکل عمده مرحله استقرار در ریزازیادی زیتون عبارت از آلودگی‌های درونی و قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها بودند. بنابراین با وجود استفاده از تیمار مناسب ضدعفونی، کاربرد تعداد زیادی ریزنمونه برای دستیابی به تعداد مناسبی ریزنمونه غیرآلوده الزامی بود. در مجموع جمع‌آوری نمونه‌ها در نیمه مرداد به دلیل سرعت رشد بیشتر شاخساره‌ها، کمتر بودن شدت آلودگی و کاهش میزان قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها برای زیتون توصیه می‌گردد. محیط کشت ۱/۲MS به‌علاوه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA می‌تواند شرایط مطلوبی را برای استقرار ریزنمونه‌های زیتون فراهم نماید. لازم به ذکر است که ریزازدیادی زیتون با تحریک رشد جوانه‌های جانبی با استفاده از منبع گیاهی بالغ هنوز دارای مشکلات زیادی است که حل آنها نیازمند آزمایش‌های مستمر است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران که هزینه‌های اجرای این پژوهش را فراهم نموده‌اند، قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱.خوشکام، ص.، نانکلی، ا. و مجیدی، ا. ۱۳۷۸. به‌دست آوردن گیاهچه زیتون رقم روغنی محلی از طریق کشت جوانه‌های جانبی در شرایط *In vitro*. نخستین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران-تهران. صفحات ۱۱۴۸-۱۱۴۷.

۲.داداشیان لنگرودی، ع. ۱۳۷۵. بررسی کمی و کیفی لیپیدها در قطعات جداکشت زیتون. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران. ۲۳۷ صفحه.

۳.لازمی زاده، ا. و مسجی، م. ۱۳۷۸. شناخت زیتون واهمیت آن در ایران. معاونت امور باغبانی وزارت کشاورزی دفتر طرح اصلاح و توسعه باغات زیتون. ۲۲ صفحه.

٤.محمدی، م. (مترجم). ۱۳۷۸. مبانی بیماری شناسی باکتریایی در گیاهان. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۳ صفحه.

۵.میرمنصوری، ا. ۱۳۷٤. آشنایی با زیتون. معاونت ترویج سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی- دفترتولید برنامه‌های ترویجی و انتشارات فنی. ۱۰۷ صفحه.

6.Bonga, J.M., and Vonaderkas, P. 1992. In Vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Pub. Netherland, 236pp.

7.Brhadda, N., Abousalim, A. Loudiyi, D. and Benali, D. 2003. Effect of culture medium on micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Moroccan Picholine. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 7(3-4): 177-182.

8.Canas, L.A., Avila, J. Vicente, M. and Benbadis, A. 1992. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj Y.B.S. (Ed), Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol: 18. High-Tech and Micropropagation II. Springer, Heidelberg, PP: 493-505.

9.Cheriqui, D., Azmi, A. Guivarc. H.A. Chiappeta, A. Dewitte, W. Reynoird, J.P. Boucheron, E. and Onckelen, H.V. 1999. Levels and *in situ* localization of endogenous cytokinins as chief factors controlling bud regeneration. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Vol. 36: 33-36. CAB Abstracts 2000.

10.Dimassi, K. 1994. *In vitro* propagation of cv. Kalamon olives *(Olea europaea* L.). Adv. Hort. Sci. 8: 185-189

11.Ercolani, G.L. 1972. Presenza epifitica di *Pseudomonas savastanoi*. Smith E.F., Stevens, sull'olivo in Pugliua. Phytopat. Mediterr 10: 130-132.

12.Fontanazza, G., Vergari, G. Patumi, M. Giorio, G., and Metzidakis, I.T. 1999. Preliminary results of the evaluation of yield components in an F1 segregant population of olive seedling from the cross (Leccino × Kalamata). Acta Hort. 474: 97-101.

13.Otero M.L., and Docampo, D.A. 1998. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina from juvenile cutting. Pyton 63(1/2): 133-140.

14.Reed, M.B., Mentzer, J. Tanprasert, P., and Xiaoling, Y. 1998. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 52: 67-70.

15.Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars with different root ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryoes. Scientia Horticulture 24: 123-134.

16.Rugini, E. 1986. Olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj Y.B.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 1. Trees I, Springer, Heidelberg, PP: .253-267.

17.Rugini, E., and Fedeli, E. 1990. Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Bajaj Y.B.S. (Ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestery, Vol. 10. Legumes and Oilseed Crops I). Springer, Heidelberg, PP: 593-641

18.Rugini, E., and Caricato, G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canini' and 'Moraiolo'. Plant Cell Reports 14: 257-260.

19.Rugini, E., Gutierrez, P. Spampinato, P.L. Ciarmiello, A., and Ambrosio, P.L. 1999. New perspective for biotechnologies in olive breeding morphogenesis, selection and gene transforamation. Acta Hort. 474: 107-110.

20.Seneviratne, P., and Wijesekara, G.A.S. 1996. The problem of phenolic exudates in *in vitro* cultures of mature *Hevea brasiliensis*. J. Plantation Crops 24(1): 54-62.

21.Seyhan, S., and Ozzambak, E. 1994. Shoot multiplication of some olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Acta Hort. 356: 35-38.

22.Singh, S.K., Sharma, H.C., and Singh, S.P. 1999. Antibiotics as an aid for *in vitro* establishment of shoot tips from field-grown papaya plants of var. 'Pusa Nanha' for mass cloning. Journal of Applied Horticulture Lucknow. 1(1): 11-14. CAB Abstracts 2000.

23.Surico, G. 1986. Indoleacetic acid and cytokinins in olive knot disease. In: Baily J.A. (Ed.) Biology and Molecular Biology of Plant-Patogen Interactions. Springer, Berlin. PP: 315-329

24.Zuccherelli, G., and Zuccherelli, S. 2002. *In vitro* propagation of fifty olive cultivars. Acta Hort. 586: 931-934.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(4), Oct - Nov 2005
www.magiran.com/jasnr

In Vitro establishment of three olive cultivars (*Olea europaea* L.)

Mahnaz Kiani Feriz[1], Zabihollah Zamani [1]and Ali Ebadi[2]
[1]Former M.Sc. student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Tehran, [2]Dept. of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran.

Abstract

Tissue culture systems provide a high efficiency for mass propagation of desired disease-free plants as well as genetic improvement. Considering these facts and the importance of olive crop, some experiments were carried out to investigate the *in vitro* establishment of three olive cultivars. For this purpose, single nodes were taken from mature container grown 'Manzanilla', 'Dezfoul' and 'Zard' olive cultivars. To find out the best disinfection method, different concentrations of NaOCl and $HgCl_2$ were used. Three sampling times i.e. 4th of February, 5th of May and 6th of August and three culture media i.e. OM, MS and MS with half strength of macro elements (1/2MS) were compared to optimize shoot establishment. The most important contamination agent was diagnosed and the controlling effect of Cefotaxime antibiotic was evaluated. Furthermore, the effects of two cytokines: Benzyladenine (BA) and Zeatin on establishment were evaluated. The Results showed that treated explants with 0.1% $HgCl_2$ for 3 min. followed by three times rinsing with sterile distilled water was the most appropriate disinfection method. Explants, which were taken on 6th of August and grown in 1/2 MS medium, gave the best results. The main contaminating agent was *Pseudomonas* bacterium which was controlled by Cefotaxime at 100 mg/l. adding 0.5 mg/l BA to 1/2 MS medium improved *in vitro* establishment of olive explants.

Keywords: Micropropagation; Establishment and Olive

www.SID.ir