فصلنامه

زیست شناسی تکوینی

سال اول، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۷

ریز ازدیادی زیتون رقم دزفول

مریم پیوندی[۱*]، مهناز منصف[۱] و مهدی حسینی مزینانی[۲]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

* (عهده دار مکاتبات) E-mail: m_peyvandi@iau-tnb.ac.ir

۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

چکیده

تاثیر نوع سیتوکینین و تعداد واکشتها بر سرعت ریزازدیادی زیتون رقم دزفول بررسی شد. جداکشتهای تک گره ای از یک گیاه گلخانه ای ٤ ساله در محیط کشت پایه DKW دارای کربوهیدرات مانیتول($۳۰gl^{-1}$) و هورمونهای ۲- ایزوپنتنیل آدنین(2-ip) یا بنزیل آمینو پورین(BAP) ($٤mgl^{-1}$) کشت شدند. سرعت رشد ریز قلمه ها، تعداد گره ها و نوساقه های حاصل از هر جداکشت در محیط کشت دارای هورمون BAP بیش از محیط دارای 2ip بود. به منظور بررسی تاثیر تعداد واکشتها، نوساقه های سترون حاصل(٥-٤ گره) برای ریز ازدیادی در مراحل بعد استفاده شدند. واکشتها با فواصل ٤٥ روز انجام شد. سرعت رشد در واکشت اول در نمونه هائی که از محیط کشت دارای هورمون 2ip به محیط کشت دارای BAP واکشت شده بودند افزایش معنی داری را نشان داد. در واکشت دوم شاخصهای رشد درنمونه هائی که از ابتدا در محیط کشت دارای هورمون 2ip کشت شده بودند بیش ازنمونه های حاصل از محیط دارای BAP بود. نتایج واکشتهای جوانه های جانبی ساقه ها در شیشه نشان داد که تکرار واکشتها منجر به کاهش سرعت ریز ازدیادی(کاهش تعداد گره ها) می گردد. به طوریکه افزایش تعداد واکشتها در همه تیمارها منجر به کاهش تعداد گره ها و نو ساقه ها در هر جداکشت شد.

واژه های کلیدی: زیتون، ریز ازدیادی، ریزقلمه، سیتوکینین

مقدمه

زیتون درختی با ارزش اقتصادی فراوان است که در سالهای اخیر مورد توجه خاص محققان قرار گرفته است. درخت زیتون به دلیل عمرزیاد و سازگاری با شرایط اقلیمی متفاوت در نقاط مختلف جهان به ویژه در کشورهای حوزه مدیترانه کشت می شود. این گیاه در روشهای سنتی معمولا با ریشه دار کردن قلمه ها تکثیر می شود. مشکلات در راه به دست آوردن پایه های سالم لزوم استفاده از روش ریزازدیادی را نشان می دهد.

روش کشت در شیشه دارای جاذبه تجاری بالایی است زیرا امکان رشد سریع و تولید با کیفیت بالای گیاهان را می دهد و ابزار مناسبی برای رسیدن به اهدافی است که در شرایط کشت در محیط طبیعی دستیابی به آنها دشوار است[۱، ۲، ۳] .

ریزازدیادی عمدتاً شامل رشد جوانه های جانبی، اندام زایی و رویان زایی است[۲، ۴، ۵، ۶]. رشد شاخه جانبی زمانی اتفاق می افتد که جوانه های فعال جانبی از تسلط انتهایی آزاد گردند. این عمل عمدتاً با استفاده از هورمونهای شیمیایی (خصوصاً سیتوکینین) در محیط کشت انجام می گیرد. مطالعات اولیه روی ریزازدیادی زیتون بوسیله Rugini (۱۹۸۴) [۷] گزارش شده بود. در دهه گذشته، پیشرفت های زیادی برای ریزازدیادی از درختان زیتون بالغ حاصل شده است [۸، ۹، ۱۰ ، ۱۱]. اگرچه ریزازدیادی بطور قابل توجهی برای بعضی ارقام

Archive of SID

www.SID.ir

زیتون پیشرفتهای چشمگیری داشته است ولی برای برخی از ارقام سخت ریشه زا خیلی موفق نبوده است [۸،۳].

هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات تیمارهای هورمونی سیتوکینین بر روی ریزازدیادی و تکثیر اندام هوایی زیتون رقم دزفول درمحیط کشت DKW [۱۲] با منبع کربوهیدرات مانیتول بود .

موادو روشها:

نمونه گیاهی از گیاه چهار ساله یک رقم ایرانی دزفول از گلخانه واقع در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی برداشت شد.

کشت نمونه ها:

شاخه های جوان گیاه گلخانه ای از گیاه مادری جدا شد وپس از حذف برگها، با آب جاری شسته شد. شاخه ها با وایتکس تجارتی۲۰٪ (۱۵ دقیقه) وشستشو با آب مقطر سترون (۵ بار) سترون کردید. پس از حذف جوانه های انتهائی، جوانه های جانبی (بخشهای دارای یک گره) در محیط کشت پایه DKW دارای هورمونهای BAP و یا ۴2-ip mgl^{-1}) کشت گردیدند.کربوهیدرات محیط کشت مانیتول(۳۰gl^{-1}) بود. نو ساقه های سترون حاصل برای مراحل بعد استفاده شد.

pH محیط کشت قبل از اضافه کردن آگار بر۵/۸ تنظیم شد، سپس محیط کشت در شرایط فشار یک اتمسفر و دمای ۱۲۰ °C سترون گردید.

واکشت نمونه ها:

بخشهای دارای دو گره از ساقه های سترون مرحله اول در محیط کشت مشابه یا متفاوت با محیط کشت پایه اولیه واکشت شدند (جدول ۱). واکشت نمونه ها ۴۵ روز یکبار انجام گرفت.

ازمایشها به صورت بلوکهای کاملا تصادفی طراحی شد. همه تیمارها حداقل با هفت تکرار و هر تکرار با چهار جدا کشت انجام شد. نمونه ها در دوره نوری ۱۶ ساعت روشنائی و در دمای ۲۴±۲°C در اتاق کشت نگهداری شدند.

تجزیه آماری :

تعداد گره ها و نوساقه ها، برگها، طول میانگره در هر جدا کشت در پایان هر دوره یادداشت شد و داده ها بر اساس نرم افزار SPSS(ver. 14) آنالیز شد. مقایسه میانگین داده ها بر اساس برنامه ANOVAو گروه بندی میانگینها براساس آزمون دانکن در سطح $p\leq0.05$ انجام شد.

نتایج:

رشد نوساقه های زیتون رقم دزفول (تعدادگره ها، تعداد نوساقه ها و برگها ی جدید) به ازای هر ریز نمونه و طول هر میان گره به تعداد واکشتها و نوع هورمون بستگی داشت.

اثر انواع سیتوکینین برروی میزان تکثیر :

مرحله کشت:

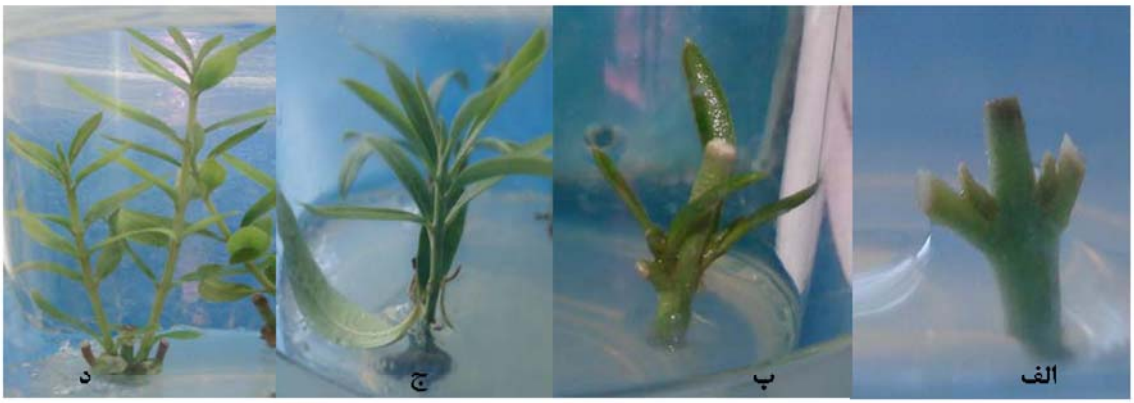
بالاترین تعداد گره ها (۳,۷۹) و تعداد برگها (۸,۹) ،تعداد نوساقه ها (۱,۷۸) و فاصله میانگره ها (۱۰,۸۴mm) در محیط کشت دارای هورمون BAP (۴mgl^{-1}) به دست آمد. اما در این مرحله تفاوتهای مشاهده شده بین دو تیمار BAP و 2ip معنی دار نبود (جدول ۱) (شکل ۱)

جدول ۱ – میانگین تعداد نوساقه ها ،گره ها ، برگ های جدید و طول میانگره ها در مراحل متوالی کشت . گروه بندی بر اساس آزمون دانکن ($p \leq 0.05$)

طول میانگره (mm)	تعداد برگها	تعداد گره ها	تعداد نو ساقه ها	تیمارهورمون($٤ mgl^{-1}$)	مرحله کشت
۸,۵۷(ab)	٦,٦٤(ab)	۳,۱۸(ab)	۱,٦۸(a)	2ip	کشت
۱۰,۸٤(a)	۸,۹۰(a)	۳,۷۹(a)	۱,۷۸(a)	BAP	کشت
٦,۳۲(bc)	٤,۸۰(bc)	۲,٤٥(abc)	۱,٥۹(a)	2ip → 2ip	واکشت اول
٥,۹۸(bc)	٤,۰۸(bc)	۲,۰٥(bc)	۱,٥۳(a)	BAP→BAP	واکشت اول
۸,۰۰(abc)	۷,۲۰(ab)	۳,۲۰(ab)	۱,۷۰(a)	2ip→BAP	واکشت اول
۸,۲٥(abc)	٥,۸٥(ab)	۲,۸۰(abc)	۱,٥۰(a)	2ip→2ip→2ip	واکشت دوم
٥,۰۰(c)	۱,٥۰(c)	۱,٥۰(c)	۱,٥۰(a)	BAP→BAP→BAP	واکشت دوم
۷,۲۰(bc)	٤,٤۸(bc)	۲,۱۲(bc)	۱,٥٦(a)	2ip→BAP→BAP	واکشت دوم

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: مراحلی از ریزازدیادی زیتون رقم دزفول : الف) کشت جد اکشت تک گره از پایه مادری در محیط کشت DKW دارای 2ip؛ ب) رشد جوانه های جانبی؛ ج) رشد نو ساقه در محیط کشت دارای 2ip؛ د) رشد نوساقه در محیط کشت دارای BAP

مرحله واکشت اول:

بیشترین تعداد گره ها (۳,۲۰)، تعداد برگها (۷,۲۰)، تعداد نوساقه ها (۱,۷۰) و فاصله میانگره ها (۸,۰۰mm) در نمونه هائی به دست آمد که از محیط کشت دارای هورمون 2ip به محیط کشت دارای BAP واکشت شده بودند (جدول ۱).

مرحله واکشت دوم:

بالاترین تعداد گره ها (۳,۸۰)، تعداد برگها (۵,۸۵) و فاصله میانگره ها (۸,۲۵ mm) در نمونه هائی به دست آمد که از محیط کشت دارای هورمون 2ip در محیطهای دارای 2ip واکشت شده بودند.تفاوت چشمگیری در تعداد نوساقه ها بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (جدول ۱).

نتایج واکشتهای جوانه های جانبی ساقه ها در شیشه نشان داد که تکرار واکشتها منجر به کاهش سرعت ریز ازدیادی(کاهش تعداد گره ها) می گردد.

برمبنای این نتایج، برای حفظ توانائی ریز ازدیادی در واکشتهای متوالی محیط DKW با منبع کربوهیدرات مانیتول و هورمون 2ip ($4\ mgl^{-1}$) پیشنهاد می گردد.

بحث:

در مطالعه حاضر اثرات تیمارهای هورمونی سیتوکینین در محیط کشت DKW بر روی تکثیر اندام هوایی زیتون رقم دزفول ارزیابی شدند.

در محیط کشت DKW با هورمون BAP، افزایش نسبی در تعداد برگها، تعدادگره و تعدادنو ساقه های هر جداکشت و طول میانگره نسبت به محیط کشت دارای 2ip مشاهده شد. ادامه واکشتها نشان داد که هورمون 2ip برای ریزازدیادی این رقم بهتر از BAP است که با گزارش هایی که قبلاً بر روی رقم ایرانی روغنی در محیط کشت DKW با هورمون 2ip ($4\ mgl^{-1}$) انجام شده است مطابقت دارد [۱۳] .برای ارقام مختلف زیتون محیط کشت های متفاوت بکاررفته است که نشان دهنده تفاوت در سازش پذیری و نیازهای بافتهای کشت شده درشیشه می باشد [۳ ، ۴، ۱۴] .در پژوهش حاضر به جای سوکروز از مانیتول استفاده شد. در برخی از گیاهان از جمله زیتون، پلی الها (یا قند الکلها) همراه با سوکروز فرآورده های مستقیم فتوسنتزی در برگهای بالغ هستند. تحقیقات نشان داده است کاربرد مانیتول در برخی از ارقام زراعی زیتون به عنوان منبع کربوهیدرات محیط کشت می تواند موجب افزایش رشد شده، کیفیت نوساقه ها را افزایش دهد[۱۳، ۱۵، ۱۶].

تنظیم کننده های رشد و ترکیبات محیط کشت، عوامل کلیدی برای تکثیر در شیشه و باززایی زیتون هستند [۵]. سیتوکینین ها نقش بسیار مهمی در رشد و پرآوری ساقه به همراه دارند و به دلیل تاثیر در تکثیر و تمایز بافت ها ،بر رشد ساقه موثر می باشند و می توانند باعث توسعه سلول شوند. شواهد نشان داده است سیتوکینینها در تقسیم یاخته ها در بافتهای گیاهی نقش کلیدی دارند. آنها تقسیم یاخته را از طریق تاثیر بر عواملی که عبور یاخته از چرخه تقسیم یاخته ای را مهار می کنند، کنترل می نماید. این هورمون علاوه بر آنکه سرعت تقسیم را تنظیم می کند، رشد جوانه های جانبی را نیز تحریک می نماید. مطالعات نشان داده است که گرچه چیرگی راسی بیشتر تحت تاثیر اکسین است، اما

Archive of SID

www.SID.ir

سیتوکینینها در اغاز رشد جوانه های جانبی نقش کلیدی دارند.از اینرو کاربرد مستقیم سیتوکینینها در جوانه های جانبی بسیاری از گونه ها فعالیت تقسیم یاخته ای آنها را تحریک نموده و موجب افزایش سرعت رشد جوانه می شود. تاثیر متفاوت سیتوکینینهای مختلف در پرآوری ارقام مختلف زیتون نشان داده است پاسخ گیاه به شدت وابسته به رقم می باشد [۹، ۱۰]. گزارش ها روی ارقام زیتون" Kalamon " [۵] و " Chondrolia Chalkidikis" [۱۴] نشان می دهد که BA اثر بیشتری نسبت به 2ip دارد که با نتایج حاصل از مرحله اول کشت همسو می باشد.

منابع :

1- Bartolini, G. and Leva, A. R.; (1990), Advances in *in vitro* culture of olive: Propagation of cv.Maurino;Acta Hort; **286**, 41-44.
2- Chaari, A.; Chaabouni, A. C.; Maalej, M.and Drira, N.; (2002), Meski Olive Variety Propagated by Tissue Culture. Acta Hort; **585**; 871-874.
3- Lambardi, M. and Rugini, E.; (2003), Micro Propagation of Olive(Olea europaea L.). In: MicroPropagation of Woody Trees and Fruits. Kluwer Academic Publisher Netherland, Editor: Daniel Mohan Bienstock, Katsuaki Ishii (Editor), ISBN-13: 9781402011351; pp: 621-646.
4- Briccoli Bati, C.; Godino, G. and Nuzzo, V.; (2002), Preliminary agronomic evaluation of two cultivars of olive tree obtained from micropropagation methods; Acta Hort; **583**, 896-870.
5- Dimassi- Theriou K.; (1994), In vitro propagation of cv. Kalamon olives (Olea europaea L.), Adv.Hortic; **8**, 185-189.
6- Peyvandi, M.; Ebnrahimzadeh, H. and Majd, A.; (2008), Somatic embryos at different maturity stages in two live cultivars; Acta Horticulturae; **2**(791); 213-216 .
7- Rugini, E.; (1984), *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root ability, and medium development using analytical data from shoot and embryos; Sci. Hort; **24**; 123-134.
8- K.; (1994), In vitro propagation of cv. Kalamon olives (Olea europaea L.), Adv. Hortic; **8**, 185-189.
9- Garcia–Ferriz, L.;Ghorbel, R.; Ybarra, M.; Belaj, A.; and Trujilio, I.; (2002), Micropropagation from adult olive trees. Acta Hort, **585**; 879-882.
10- Leva, A. R., Petruccelli, R.; and Polsinelli, L.; (2004), *In vitro* propagation From the laboratory to the production line.Olivae; **101**; 18-26.
11- Mendoza-de Gyves, E.; Mira, F. R. and Rugini, E.; (2008), Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea L.*) by using dikegulac; Plant cell tiss. Org. Cult*;* **92**, 233-238.
12- Zacchini, M., & De Agazio, M.; (2004), Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation, Biologia Plantarum; 48(**4**);589-592.
13- Driver, J. A. and Kuniyuki, A. H.; (1984), *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock [Juglans hindsii X Juglans regia, tissue culture] .Hort. Sci.; **19**; 507-506.
14- Farahani, F.; Peyvandi, M. and. Hosseini-Mazinani; M.; (2008), Effect of sucrose and mannitol on in vitro regeneration of Iranian olive cv. "Rowghani"; Acta Horticulturae; 2(**791**); 206-209.
15- Grigoriadou K.; Miltiadis, V. and Eleftherios, E. P.; (2002), In vitro propagation of the Greek olive cultivar ' Chondrolia Chalkidikis', PPlant Cell Tissue and Organ Culture, 71(1); 47-54.
16- Conde, C.; Silva, P.; Agasse, A.; Lemoine, R.; Delrot., S.; Tavares, R. M.; and Gerós, H.; (2007), Utilization and Transport of Mannitol in *Olea europaea* and Implications for Salt Stress Tolerance. Plant Cell Physiol.; **48**, 42-53.
17- Leva, A. R.; Petruccelli R.; and Bartolini , G.; (1994), Mannitol *in vitro* culture of Olea europaea L. Cv. Maurino .Acta Hort; **336**;43-46.

Archive of SID

www.SID.ir