ریزازدیادی زیتون *Olea europaea* L.

محسن نصیری[1]

چکیده

در این بررسی جوانه‌های انتهایی و جانبی (قطعات گره دارای دو جوانه) از پایه‌های برتر موجود در رویشگاه طبیعی زیتون از جمله طارم، منجیل، رودبار و گرگان و نیز پایه‌های موجود در مؤسسه محل تحقیق در فصول مختلف سال برداشت شد و پس از اعمال تیمارهای ضدعفونی‌کننده با دو عامل کلرور مرکوریک و هیپوکلریت سدیم و نیز تلفیقی از آنها، روی دو محیط کشت پایه MS و OM استقرار یافتند.

نمونه‌های مستقر شده جهت تحریک شاخه‌زایی به همان دو محیط پیشین حاوی BAP (۳-۱ میلیگرم در لیتر) منتقل شدند. پس از تولید تعداد کافی شاخه، شاخساره‌ها به دنبال یک مرحله زیرکشت در محیط MS فاقد هورمون به محیط ریشه‌زا که همان محیط MS با کاهش غلظت نیترات و مقادیری از دو اکسین IBA و NAA (۲-۰/۵ میلیگرم در لیتر) است به طور جداگانه منتقل شدند. هم‌زمان با شروع مرحله ریشه‌زایی و نیز کاربرد اکسین از تیمار تاریکی نیز استفاده شد. نمونه‌های ریشه‌دار شده به گلدانهای حاوی پرلیت، ورمیکولیت، شلتوک و ماسه بادی (۱:۱:۱:۱ حجمی) منتقل شدند.

نتایج بدست آمده نشان دادند که بهترین زمان برای نمونه‌برداری اواسط پاییز و مناسبترین تیمار ضدعفونی کننده استفاده از کلرور مرکوریک ۰/۱٪ به مدت ۲ دقیقه پس از دیپ الکلی و مسواک کشی با مایع ظرفشویی و شستشو در جریان مداوم آب به‌شمار می‌روند. در بررسی حاضر کاربرد قارچ‌کشها اثری در کاهش آلودگی قارچی

۱- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

نشان ندادند.

مناسبترین محیط جهت استقرار نمونه‌ها OMکامل حاوی ۰/۵ppm از BAP و محیط مطلوب شاخه‌زایی MS کامل حاوی ۱ppm از BAP بود. مطلوبترین شرایط جهت ریشه‌زایی شاخساره‌ها، استفاده از محیط MS N/2 حاوی 1ppm از هورمون IBA و نگهداری آنها به مدت یک هفته در تاریکی مطلق بود.

اگرچه کاربرد آنتی‌بیوتیکها جهت حذف آلودگیهای باکتریایی به حذف موقت آنها منجر شد، ولی رشد نمونه‌ها تحت تأثیر قرار گرفت (تیمار مناسب کاربرد کربنیسیلی با غلظت ۳۰۰ppm بود). روش مناسب حذف آلودگی باکتریایی این گیاه، استفاده از جوانه‌های انتهایی و زیر کشتهای سریع در مراحل نخستین کشت بود.

مقدمه:

۱ - ۱ - اهمیت: زیتون (*Olea europaea* L.) مهمترین و مفیدترین گونه گیاهی جنس *Olea* است و به خانواده *Oleaceae* تعلق دارد. در فرهنگ اسلامی برای این گیاه قداست خاصی قایل هستند و در قرآن مجید ۶ مرتبه با احترام به زیتون اشاره گردیده و علاوه بر اینکه به آن سوگند یاد شده است، از پرورش آن با آب باران به عنوان قدرت و آیات الهی برای اهل تفکر یادآوری شده است[۱]. در سایر ادیان الهی نیز این گیاه حرمت خاصی دارد. مسیحیان براساس یک سنت دیرینه در جشنهای سال نو نهالهایی از کاج و زیتون را تزیین می‌کنند و در کتاب مقدسشان بیش از ۲۰۰ مرتبه از این گیاه به نیکی یاد شده است (۲، ۴ و ۱۰).

۲ - ۱ - زیستگاه: در مورد منشأ و رویشگاه نخستین زیتون نظرهای مختلفی وجود دارد. برخی از پژوهشگران معتقدند که این گیاه ابتدا در آسیای صغیر، کشورهای

۱- سوره انعام آیات ۹۹ و ۱۴۱، سوره نور آیه ۳۵، سوره نحل آیه ۱۱، سوره عبس آیه ۲۹ و سوره تین آیه ۱

سوریه، ترکیه، ایران و فلسطین ظاهر و تکامل یافته است و سابقه ۶۰۰۰ ساله دارد و از این مناطق به سمت غرب و کرانه‌های دریای مدیترانه گسترش یافته است (۲، ۸، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۲۴). برخی دیگر از صاحبنظران معتقدند که موطن اصلی و نخستین زیتون اروپا و به ویژه ایتالیا بوده و از آنجا به سمت سوریه و ایران انتشار یافته است (۳، ۴، ۷ و ۱۰).

گسترشگاه زیتون در حال حاضر عمدتاً اطراف دریای مدیترانه واقع است، به طوری که در بعضی از سیستمهای آب و هوایی نام زیتون را با اقلیم مدیترانه‌ای مترادف دانسته و شاخصی برای شناسایی این نوع اقلیم می‌دانند (۱۰ و ۱۸). تعدادی از محققان، زیتون را تنها نماینده مدیترانه‌ای از ۳۵ گونه جنس *Olea* می‌دانند (۱۵، ۱۶). آمار موجود از درختان زیتون در جهان نشان می‌دهد که از ۸۰۵ میلیون اصله درخت زیتون که مساحت ۹/۶ میلیون هکتار را پوشش داده است، ۹۷٪ آن در اطراف مدیترانه و ۳٪ بقیه در آمریکا و اقیانوسیه پراکنده است (۳، ۱۴ و ۱۶). کشورهای ایتالیا، اسپانیا و یونان به ترتیب بیشترین تعداد درختان زیتون جهان را در خود جای داده‌اند و از کل روغن زیتون تولید شده در جهان، ۶۰/۸٪ آن به اسپانیا و ایتالیا تعلق دارد (۴ و ۱۷).

نواحی زیتون‌کاری در ایران عمدتاً استانهای گیلان و زنجان است که شامل مناطق: گنجه، منجیل، رودبار، لوشان، رستم‌اباد، طارم علیا و سفلی یا به‌طور کلی حاشیه رودخانه‌های قزل اوزن و سفیدرود در این مناطق می‌شود. تعداد قابل توجهی درخت زیتون نیز در نواحی ریجاب، قصرشیرین، گیلان غرب، گرگان و گنبد، استانهای کرمان، فارس و خوزستان می‌رویند (۳، ۴، ۸، ۱۰ و ۱۱).

۳- ۱- روغن زیتون: تولید متوسط سالانهٔ روغن زیتون در ایران ۱۵۰۰-۱۲۰۰ تن است که بخش ناچیزی از مصرف داخلی را تأمین می‌کند (۹). بیش از ۷۰٪ از روغن خوراکی کشور از خارج تأمین می‌شود و این در حالی است که برای واردات هر تن روغن آماده مصرف ۱۰۰۰ دلار ارز خارج می‌شود. تنها در سال ۱۳۷۲ حدود ۷۱۲۰۰۰ تن

روغن مصرفی از خارج تأمین شد که این مقدار ۸۹٪ کل روغن مصرفی کشور بود (۱، ۵). این آمارها لزوم توجه به تولید روغن را از منابع موجود در داخل کشور و نقش آن در کاهش واردات روغن چه به صورت ماده خام و یا آماده مصرف آشکار می‌سازد. با توجه به مقاومت، کم‌نیازی و سازگاری زیتون به انواع خاکها و امکان کاشت آن در خاکهای فقیر کم‌عمق و سنگلاخی و نیز وجود مناطق مستعد در بسیاری از نواحی کشور، توجه به توسعه زیتون‌کاری امری اجتناب‌ناپذیر است.

۴-۱- *شرایط اکولوژیک مناسب:* زیتون در مناطقی با بارندگی سالانه ۲۵۰-۲۰۰ میلیمتر قابلیت استقرار، رشد و نمو دارد، با این حال در چنین مناطقی برای تولید اقتصادی به آبیاری نیاز دارد. مناطقی که ۸۰۰-۴۰۰ میلیمتر بارندگی سالانه و زمستانهای ملایم و تابستانهای گرم و به نسبت مرطوبی دارند جهت کاشت و رویش زیتون بسیار مناسب بوده و می‌توان در آنها به کاشت زیتون بدون نیاز به آبیاری و مراقبتهای خاص اقدام نمود. اگرچه زیتون گیاهی کم‌توقع بوده و به اکثر خاکها سازگار است و حتی در سواحل صخره‌ای نیز قادر به رشد است (۴، ۱۰ و ۲۰) ولی در خاکهای عمیق، رسی شنی با pH قلیایی از رشد و نمو مطلوبی برخوردار بوده، پاجوش فراوانی تولید می‌کند و تولید میوه بیشتری خواهد داشت (۴، ۹ و ۱۳). تراکم روغن در میوه زیتون در زمینهای آهکی افزایش می‌یابد (۱۰ و ۱۱). در برابر خاکهای شور و حاوی بر مقاوم است (۱۹). pH مناسب خاک برای رویش زیتون ۸-۶/۵ می‌باشد (۴، ۱۲ و ۱۷). خاکهای اسیدی یا بسیار گوگردی و خاکهای به‌طور کامل رسی فشرده با رطوبت زیاد و غرقابی برای رشد زیتون مناسب نیستند (۱۵ و ۲۰). زیتون محدوده دمایی بین ۱۰- تا ۴۰ درجهٔ سانتیگراد را تحمل می‌کند، در برابر یخبندانهای طولانی به نسبت مقاوم است. مناسبترین دما برای لقاح، تشکیل و رشد میوه آن ۲۵°c است (۷ و ۱۰). ارتفاع درخت زیتون به ۸-۵ متر می‌رسد، و در شرایط مطلوب تا ۱۵ متر نیز رشد می‌کند (۷، ۱۰). این گیاه در نقاط مناسب در سن ۶ سالگی محصول قابل قبولی تولید می‌کند، تا ۵۰ سالگی

محصول اقتصادی می‌دهد و تولید آن تا قرنها ادامه می‌یابد (۴ و ۹). عمر درخت زیتون را ۲۰۰۰-۱۰۰۰ سال تخمین زده‌اند (۱). طولانی بودن دوره زندگی این گیاه را به سبب وجود غده‌بن‌هایی می‌دانند که در قاعده تنه آن می‌روید و پر از جوانه نابجاست (۱۵). از نظر دامنهٔ مناسب ارتفاعی رویش، اگرچه در منابع حداکثر ۱۳۰۰-۱۰۰۰ متر از سطح دریا ذکر شده است (۴، ۸ و ۱۲)، ولی در جنگلهای تنک موجود بین سیرجان و اسفندقه در ارتفاعات ۲۰۰۰ و حتی ۲۵۰۰ متری نیز دیده شده است (۹). زیتون در رویشگاه طبیعی در ارتفاع ۸۰۰-۶۰۰ متر از سطح دریا از رشد مناسبی برخوردار است (۴، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲).

۵-۱- ***موارد استفاده:*** زیتون از معدود گیاهانی است که کلیه قسمتهای آن قابل استفاده بوده و مصارف خوراکی، دارویی، صنعتی و بهداشتی دارد. تنها ۷٪ از میوه زیتون تولید داخلی به صورت کنسروی (سبز یا سیاه) مصرف می‌شود (۱ و ۱۶) و از بقیهٔ آن روغن استحصال می‌گردد. ۶۰-۴۰٪ وزن میوه را روغن تشکیل می‌دهد که یکی از بهترین روغنهای گیاهی با مصارف متعدد است. به سبب وجود اسیدهای چرب اولئیک (۸۵-۶۵٪)، لینولئیک (۱۵-۴٪)، پالمیتیک (۱۶-۷٪)، استئاریک (۳-۱/۴٪) میریستیک (۱/۳٪) و کمی آرشیدک و نیز ویتامینهای A، C، D، E و مقدار زیادی کلسیم (معادل کلسیم موجود در شیر تازه گاو)، از ارزش غذایی بسیار زیادی برخوردار است (۱، ۴، ۵، ۷ و ۹) روغن حاصل از پالایش سوم آن در صنعت صابون‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). مان حاصل از پوست درخت زیتون نیز ارزش غذایی و دارویی دارد (۴). زیتون چوبی بسیار سخت، سنگین، با دوام، پرنقش و نگار و بسیار صیقل‌پذیر دارد و در صنایع ظریفه، تهیه روکشهای تزئینی چوبی، ظروف و گلدانهای چوبی نفیس و وسایل خانگی استفاده می‌شود (۴، ۹ و ۱۰).

۲- سابقه تحقیق:

۱-۲- *در ایران:* تاکنون گزارش کاملی از تولید نهال زیتون از طریق کشت بافت و انتقال به مزرعه منتشر نشده است. خوشکام و نانکلی (۱۳۷۳) با قرار دادن جوانه‌های زیتون به مدت یک ساعت در محلول ۲ در هزار GA3 و استقرار ریزنمونه‌ها در محیط کشت پایه MS و به دنبال آن کاربرد هورمونها موفق به شاخه‌زایی شدند. آنها همچنین با القای کالوس در محیط‌های باززایی به ایجاد جنینهای غیرجنسی اقدام نموده و از این جنین‌ها، گیاهچه به دست آوردند. شرایط اتاقک رشد در این بررسی، دوره نوری ۱۶-۸ ساعت (نور - تاریکی) و دمای ۲۴°C بود (۶). سلطانی و همکاران (۱۳۷۵) در بررسی دو روش تولید نهال زیتون، در کنار کاشت هسته‌های زیتون در مراحل مختلف رسیدگی بذر، کشت بافت این گیاه را با استفاده از جوانه‌های رقم مانزانیلا مورد بررسی قرار دادند. تیمارهای در نظر گرفته شده جهت بررسی مذکور نشان می‌دهند که مناسبترین محیط کشت جهت استقرار ریزنمونه‌ها، محیط کشت OM ولی با عناصر پرمصرف $\frac{1}{4}$ و عناصر کم‌مصرف $\frac{1}{2}$ و کاهش منبع کربن بود. در مورد ریشه‌زایی محیط بهینه OM کاهش یافته (۱/۲) فاقد ویتامین و مواد آلی، ولی حاوی NAA بوده است. در چنین شرایطی شاخساره‌ها پس از ۳ الی ۴ هفته ریشه‌دار شده و گیاهچه‌های حاصل به گلدان منتقل گردیدند (۸).

۲-۲- *در سایر کشورها:* بررسی منابع در مورد کشت بافت زیتون در جهان نشان داد که در طول دو دهه اخیر تحقیقات وسیعی در این زمینه صورت گرفته و بیشینه این پژوهشها مربوط به روجینی است. در این بررسیها تاکنون با استفاده از محیط کشتهای مختلف و ریزنمونه‌های متفاوت، چندین روش در کشت آزمایشگاهی زیتون بدست آمده است. متأسفانه در اکثر این تحقیقات نمونه‌های نخستین به نحوی انتخاب شده‌اند که نمی‌توان به خلوص ژنتیکی و همگروه‌سازی آنها اطمینان داشت، زیرا اغلب پس از ایجاد کالوس در نمونه‌ها به ایجاد گیاهچه اقدام شده است که به سبب ایجاد تغییرات

سوماکلونالی، ثبات ژنتیکی پایه مادری آنها حفظ نخواهد شد. منابع نخستین تولید گیاهچه در بیشتر این بررسیها عبارتند از: جنین‌های نابالغ یا بالغ، قطعات لپه، بخشهای مختلف دانه‌رست از جمله هیپوکوتیل، اپیکوتیل، برگچه‌ها (۱۴، ۱۸ و ۲۶)، مزوکارپ میوه (۲۱)، نوک جنین (۳۵)، و نیز بخشهایی از اندامهای رویشی (جوانه و قطعات گره) گیاهچه‌های آزمایشگاهی حاصل از جنین، لپه و یا دانه‌رست (۱۹، ۳۱ و ۳۴)، دمبرگ، پهنک و رگبرگ میانی، قطعاتی از غده‌بن[1] و نیز پرتوپلاستهای جدا شده (۱۵، ۱۶ و ۳۰).

در این قسمت تحقیقات انجام شده در مورد کشت بافت زیتون را مرور خواهیم کرد و جهت انسجام مطالب، گزیده‌ای از نتایج بدست آمده از این بررسیها را براساس سال انتشار ارایه خواهیم کرد و چون روجینی بیشترین تحقیقات را در این زمینه به خود اختصاص داده و مقالاتش مکمل یکدیگرند به این رشته از مقالات به طور جداگانه و نیز براساس قدمت اشاره می‌کنیم.

نخستین گزارش دربارهٔ کشت آزمایشگاهی زیتون که تنها به تشکیل کالوس منجر گردید در سال ۱۳۶۹ توسط Lavee و همکارانش منتشر شد (۲۳). نامبرده به اتفاق Adiri (۱۹۷۴) در پژوهش دیگری به بررسی اثر نور و تنظیم‌کننده‌های رشد بر رشد کالوس زیتون در شرایط درون‌شیشه‌ای پرداخت. آنها ریزنمونه‌های زیتون رقم مانزانیلا را در محیط کشت حاوی دو برابر عناصر پرمصرف وایت و ۲۰ گرم در لیتر ساکارز قرار دادند. ترکیب هورمونی محیط کشت مورد استفاده آنها شامل: ۲mg/l از IAA و ۰/۲mg/l کاینتین بود. در این مقاله هیچ‌گونه اشاره‌ای به اندام‌زایی نشده است (۲۲). گزارش دیگری از همین محقق (Lavee، ۱۹۷۷) نشان داد که با استقرار مزوکارپ میوه همان رقم زیتون در محیط کشت مذکور نیز مقدار زیادی کالوس بدست آمد، ولی در

1- Ovuli

این‌باره نیز اندام‌زایی مشاهده نشد (۲۱).

Grossoni (۱۹۷۹) به منظور بررسی مناسبترین زمان نمونه‌برداری جهت کشت بافت زیتون ریزنمونه‌های رقم فرانتویو[1] را در زمانهای مختلف مورد استفاده قرار داد و متوجه شد که مناسبترین زمان نمونه‌برداری جهت تکثیر آزمایشگاهی این رقم در شرایط ایتالیا به ترتیب دسامبر و فوریه است و محیط کشت مطلوب جهت کالوس‌زایی و ریشه‌زایی، محیطی است که شامل نصف علظت عناصر پرمصرف نوپ[2] و غلظت کامل عناصر کم‌مصرف هلر[3] باشد. ترکیب هورمونی مناسب ریشه‌زایی در این پژوهش کاربرد ۱mg/l از NAA بود (۱۹).

اولین گزارش موفق از اندام‌زایی زیتون در شرایط آزمایشگاه در سال ۱۹۸۰ توسط بائو و همکاران منتشر شد. آنها موفق شدند با استفاده از نمونه‌های حاصل از محور زیرلپه زیتون در محیط کشت وایت[4] حاوی ۰/۵mg/l هورمون BA و ۰/۱mg/l هورمون NAA شاخه‌زایی کنند. محیط کشت آنها حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و همچنین اسیداستئاریک بود (۱۴).

در سال ۱۹۷۹ روجینی در اولین مقالهٔ خود در زمینهٔ کشت بافت زیتون، موفقیت شاخه‌زایی، رشد طولی و نیز ریشه‌زایی گیاهچه‌های زیتون رقم جیرافا[5] در محیط کشت MS به ترتیب حاوی ۵mg/l کاینتین در مرحلهٔ شاخه‌زایی ۰/۵mg/l از GA در مرحلهٔ رشد طولی و ۱mg/l از IBA در مرحله ریشه‌زایی را گزارش کرد (۳۸). محقق مذکور با همکاری Fontanazza (۱۹۸۱) موفقیت اندام‌زایی کامل ریزنمونه‌های برگرفته از رقم Dolce Agogia را گزارش کرد. محیط شاخه‌زای آنها MS/2 حاوی ۱mg/l از آتین و ۰/۵mg/l از هریک از هورمونهای IBA و GA بود. محیط ریشه‌زای

1- Frantoio
2- Knop
3- Heller
4- White
5- Girafa

آنها شامل عناصر پرمصرف نوپ و عناصر کم‌مصرف هلر بود و بیشترین میزان ریشه‌زایی در حضور ۴mg/l از NAA مشاهده شد (۳۷). این محققان طی گزارش دیگری در همان سال (۱۹۸۱) اعلان داشتند که موفق به انتقال گیاهچه‌های آزمایشگاهی رقم Dolce Agogia به گلدان شده‌اند (۳۶). روجینی در سال ۱۹۸۴ با بررسی و تجزیه و تحلیل عناصر معدنی نوک شاخه‌های زیتون یک محیط کشت اختصاصی جهت کشت بافت ارقام زیتون ایتالیایی (OM) را معرفی کرد. در این گزارش توصیه شده است که با غوطه‌ور نمودن ریزنمونه‌ها در آب دوبار تقطیر سترون شده حاوی گلوتاتیون احیا شده می‌توان قدرت شاخه‌زایی را افزایش داد. این محقق در سال ۱۹۸۶ گزارش کرد که با استفاده از کشت نوک جنین در محیط کشت MS/2 حاوی ۲mg/l از آتین و ۱۰ گرم در لیتر ساکارز، گیاه کامل بدست آورده است (۳۴). در مقاله منتشر شده در سال ۱۹۸۸، این پژوهشگر به منظور تولید گیاهچه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی به کشت قرصهای کوچکی از برگ سه رقم زیتون (Moraiolo, Frantoio, Dolce Agogia) و نیز جنینهای نابالغی اقدام کرد که در زمانهای مختلف پس از شکوفایی کامل گل (۵۰، ۷۵، ۹۰، ۱۰۵ روز) جمع‌آوری شده بودند و توان جنین‌زایی آنها در دو محیط کشت MS/2 و OM/2 حاوی BAP همراه با 2,4-D یا NAA بررسی کرد. نتایج نشان دادند که جنین‌زایی سوماتیکی به‌طور مستقیم از جنینهای زیگوتی ۴۰٪ بیشتر بود و تنها جنین‌های ۷۵ روزه در محیط حاوی مقادیر کم اکسین و سیتوکنین قادر به عمل بودند و 2,4-D باعث مهار جنین‌زایی سوماتیکی شد. در جنین‌های جوانتر یا مسنتر از ۷۵ روز و نیز قرصهای برگی، تنها کالوس و ریشه مشاهده شد. جنین‌های سوماتیکی جوانه زده حاصل از این بررسی به گیاهچه تبدیل و به گلدان منتقل شدند (۳۳). روجینی طی سالهای ۱۹۹۳-۱۹۹۱ با انتشار مقالاتی نتایج تحقیقات خود را دربارهٔ اثر پلی‌آمینها در اندام‌زایی شاخساره‌های آزمایشگاهی زیتون منتشر کرد. در سال ۱۹۹۱ با سایر همکاران به بررسی پلی‌آمینهای درونی و نقش آنها بر ریشه‌زایی

قلمه‌ها و ریزنمونه‌های زیتون در شرایط آزمایشگاهی پرداختند و متوجه شدند که با قرار دادن قاعدهٔ قلمه‌ها و یا تیمار ریزنمونه‌ها در پوترسین، آب اکسیژنه و مانیتول با یا بدون حضور IBA، ریشه‌زایی تسریع می‌شود. در بررسی آنها مشخص شد که با استفاده از هر سه عامل مذکور به طور جداگانه و یا همراه با IBA نه تنها ریشه‌زایی تسریع می‌شود بلکه تعداد ریشه‌ها نیز افزایش می‌یابد. پس از تجزیه و تحلیل محتوای پلی‌آمینی (پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین) در اولین، سومین و هفتمین روز پس از شروع تیمار، مشخص شد که محتوای اسپرمیدین‌های پیوسته در روز سوم به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که اسپرمیدین احتمالاً در القای ریشه نقش داشته و ارتباطی بین افزایش میزان این پلی‌آمین با کاهش سایر مواد موجود در نمونه‌ها وجود دارد (۳۲). در سال ۱۹۹۲ در ادامه بررسی اثر پلی‌آمینها بر ریشه‌زایی اظهار داشت که اگر پلی‌آمینهای پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین با غلظت یک میلی‌مول به مخلوط با ۵ میکرومول اکسین به محیط کشت زیتون اضافه شوند، هم زمان ظهور ریشه‌ها کاهش می‌یابد و هم درصد ریشه‌های تولید شده به ازای نمونه افزایش می‌یابد. با انجام TLC کل پلی‌آمیناز (PA_s) درونی نمونه‌ها مشخص شد که سطح PA_s در نمونه‌های تیمار شده در روز دوم کمتر از شاهد است، در حالی که در روز پنجم PA_s در هر دو مورد یکسان بود (۳۱). در سال ۱۹۹۳ همین محقق و همکارانش ارتباط بین تیمار پوترسین و ریشه‌زایی را در شرایط آزمایشگاهی چند گونه درختی مثمر سخت ریشه‌زا از جمله شاه‌بلوط، گردو، بادام، زردآلو و گلابی بررسی نمودند. او طی مراحل پرآوری شاخه[1] و نیز ریشه‌زایی، پوترسین را به محیط کشت مایع دو لایه اضافه کردند. شاخساره‌های تیمار شده هم در دورهٔ نوری ۱۶ ساعته و هم با تیمار فوق و نگهداری قاعدهٔ آنها در تاریکی، ریشه‌دار شدند. پوترسین ریشه‌زایی شاخه‌های سیب (پایه M_9 و

1- Proliferation

کلون P_3) را افزایش داد. در دورهٔ نوری ۱۶ ساعته در قاعده شاخساره‌های زیتون ریشه‌ها ظاهر شدند، ولی در گردو باعث کاهش ریشه‌زایی شده و در مورد شاه‌بلوط، بادام، جوجوبا و زردآلو مؤثر واقع نشد. جهت ریشه‌زایی این گونه‌ها، نگهداری قاعده شاخساره‌ها در تاریکی الزامی بود. در این بررسی محتویات درونی پرکلریک اسید و پلی‌آمین آزاد در پایان مرحله پرآوری شاخه در گونه‌های زیتون، شاه‌بلوط و گردو اندازه‌گیری شده و مشخص گردید که شاخساره‌های گردو سطح بالاتری از اسپرمین دارند. محتوای پلی‌آمین آزاد نهایی در زیتون کم، در شاه‌بلوط متوسط و در گردو زیاد گزارش شد. احتمالاً این محتوای پلی‌آمینی با پاسخ به تیمارهای پوترسین رابطه‌ای معکوس دارد (۳۰).

لویس و همکاران (۱۹۸۷)، به هدف تکثیر آزمایشگاهی زیتون به کشت درون‌شیشه جنین‌های جدا شدهٔ زیتون اقدام کردند. این محققان اظهار داشتند که جوانه‌زنی این جنین‌ها نسبت به بذر کامل، سریعتر بوده و در صورتی که منبع تکثیر، میوه‌های همان فصل باشد، ۴۰٪ جنین‌ها قادرند به گیاهچه تبدیل شده و در مدت سه ماه تثبیت شوند. هنگامی که از نمونه‌های گره حاصل از این گیاهچه‌ها برای تکثیر مجدد استفاده شد مشخص گردید که القای شاخه و ریشه در آنها به سهولت انجام‌پذیر است. شاخه‌زایی با استفاده از سه عامل زآتین، BAP و 2ip به‌طور یکسان انجام شد. در مورد القای ریشه در شاخساره‌ها مصرف IBA ضروری بود و برای نمو بعدی ریشه‌ها به تیمار تاریکی نیاز بود (۲۴). راما و پونتیکس (۱۹۹۰) ریزازدیادی زیتون را با استفاده از نمونه‌های گره حاصل از شاخه‌های رشد یافته از تخمدان زیتون در اتاقک رشد شرح دادند. تکثیر شاخه در محیط تغییر یافته OM حاوی ۰/۵mg/l سیستئن، ۱mg/l پانتوتنیک اسید کلسیم، ۰/۵mg/l اسیدجیبرلیک، ۰/۱mg/l از IAA، ۱۰mg/l از آتین ریبوزاید یا ۷mg/l از BA و یا ۱۰mg/l از 2ip انجام شد. شاخساره‌های تولید شده، در محیط ریشه‌زایی که مشابه محیط شاخه‌زایی، ولی فاقد هرگونه سیتوکینین و حاوی

اکسین (IBA یا NAA در غلظتهای ۱، ۲ و ۳ میلیگرم در لیتر از هرکدام بود) ریشه‌دار شدند. با افزودن عصارهٔ خام تخمدان زیتون به محیط کشت، اندام‌زایی هر دو پدیده (هم شاخه‌زایی و هم ریشه‌زایی) افزایش نشان دادند (۲۹). اورینوز و میترکور (۱۹۹۱) موفق شدند اندام‌زایی را در کالوس حاصل از قطعات لپه و ریشه‌چه‌های بدست آمده از جنین‌های زیگوتی بالغ القا کنند. آنها متوجه شدند که در طی اولین دوره زیرکشت که ۳۰ روز به طول انجامید ریشه‌زایی انجام و طی دومین زیرکشت در همان مدت زمان جنین‌زایی حاصل شد. ریشه‌زایی با غلظتهای کم IBA (۰/۵ و ۲/۵ میکرومول) و 2ip (۰/۵ میکرومول) شدت یافت. با کاهش غلظت نمکها و قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲۱ روز در تاریکی، ریشه‌زایی باز هم شدت گرفت. با کاربرد دو هورمون 2ip و IBA در غلظتهای زیادتر از ۵ میکرومول جنین‌زایی سوماتیکی مهار شد، ولی کاهش غلظت نمکها یا نگهداری در تاریکی در این پدیده تأثیری نداشت (۲۷). میتروکوز و همکاران (۱۹۹۲) با بررسی اثر سن و منشأ کالوس بر توسعه اندام‌زایی به تحقیقی مشابه پژوهش فوق پرداختند. آنها کالوسهای ۰، ۷، ۱۴ و ۲۱ روزه حاصل از ریشه‌چه و قطعات لپه جنین‌های بالغ زیگوتی زیتون را از نظر ریشه‌زایی و جنین‌زایی مورد آزمون قرار دادند. نمونه‌ها در محیط کشت OM که به آن ۲/۵ میکرومول 2ip و ۲۵۰ میکرومول IBA اضافه شده بود کشت شدند. مناسبترین زمان ظهور ریشه‌ها با این تیمار یک دوره ۲۱ روزه گزارش شد (۲۶). ازکایا (۱۹۹۲) در طرح دانشجویی خود به بررسی توانایی باززایی کولتیوارهایی از زیتون یونان، یکی سخت ریشه‌زا (Kalamata) و دیگری آسان ریشه‌زا (Koroneiki) پرداخت. نمونه‌های مورد استفاده شامل قطعات گره شاخه‌های قوی رشد سال جاری پس از هرس درختان ۱۸ ساله و شاخه‌های رشد جدید پس از کاشت پاجوشها در مورد هر دو کولتیوار و نیز شاخه‌های رشد جدید پس از کاشت سرشاخه‌های تاج کولتیوار کورنیکی بودند.

توانایی باززایی به اندازه‌گیری برگها، وزن خشک و ظهور ریشه ارزیابی شد. دو

کولتیوار از نظر تولید شاخه اختلاف معنی‌داری نداشتند، ولی شاخه‌های تولید شده از نمونه‌های کورنیکی از نظر بلندی و تعداد بیشتر برگها روی شاخه اختلاف معنی‌داری با کالاماتا نشان دادند. در مورد ریشه‌زایی که ۴۰ روز پس از انکوباسیون یادداشت برداری شد، میزان آن در مورد کالاماتا ۲۹ و برای کورنیکی ۴۵ بود. این ریشه‌ها تنها روی شاخساره‌های حاصل از قطعات گره شاخه‌های قوی رشد جاری مشاهده شد و سایر نمونه‌ها ریشه ایجاد نکردند (۲۸). ماسیمو با همکاری روجینی (۱۹۹۳) به منظور بررسی قدرت اندام‌زایی بخشهای مختلف برگ زیتون، به کشت دمبرگ، قطعات پهنک و رگبرگ میانی چند کولتیوار زیتون که در سه شرایط مختلف (مزرعه، داخل گلدان در گلخانه و یا سرشاخه‌های گیاهچه‌های آزمایشگاهی) رشد یافته بودند اقدام نمودند. محیط کشت مورد استفاده آنها OM و MS با مقادیری از 2ip، زآتین، تیدیازورون و کمی اکسین بود. در این پژوهش شاخه‌های نابجا فقط از نمونه‌های دمبرگ شاخه‌های رشد یافته در شرایط آزمایشگاه کولتیوارهای موریولو و دولچه آگوجا پس از دو تا سه هفته در محیط کشت اختصاصی زیتون (OM) حاوی ۱۸ میکرومول زآتین بدست آمد. اندام‌زایی در محیط تغییر یافته فقط در تاریکی انجام شد. در بررسی آنها مشخص شد که توان اندام‌زایی در دمبرگهای گرفته شده از گره‌های انتهایی شدیدتر از گره‌های قاعده‌ای است (۲۵).

۳- مواد و روشها

۱-۳- *تهیهٔ نمونهٔ گیاهی:* در این بررسی جوانه‌های انتهایی و جانبی (قطعات گره و جوانه‌ای) از پایه‌های بسیاری از ارقام زیتون موجود در کشور به ویژه ارقام کاشته شده در ایستگاه تحقیقات زیتون رودبار (بلیدی، کلوناویچ، ماری و زرد)، سازمان تحقیقات کشاورزی گرگان و گنبد، پایه‌های موجود در مؤسسهٔ محل تحقیق (کاشته شده در منطقه نمایشی Disply که با شماره‌های 86.92.0.E2 و 86.92.0.E4 مشخص شده و نیز

ارقام ماری کاشته شده در باغ میوه)، تعدادی از پایه‌های کهنسال و مقاوم موجود در حد نهایی رویشگاه زیتون در دو استان زنجان و گیلان مناطق طارم علیا، گیلوان، آببر، رودبار و منجیل (ارتفاع ۵۳۰ تا ۸۶۰ متر) در فصول مختلف سال برداشت و در شرایط سرد و مرطوب به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان استفاده در یخچال (+۴°C) نگهداری شدند. چون نمونه‌های جوانتر از توان اندام‌زایی بیشتری برخوردارند تلاش شد که نمونه‌های مورد نظر حتی‌المقدور در مورد پایه‌های بسیار قدیمی، از جستها، پاجوشها و یا تنه‌جوشهای جدید تهیه گردد.

۲-۳- ***مواد، دستگاهها و وسایل:*** مواد شامل: الکل (اتانول و متانول) هیپوکلریت سدیم یا مایع سفیدکننده تجارتی، کلرور جیوه، قارچ‌کش، مواد پاک کننده (مایع صابون و مایع ظرفشویی) چند بافر، اسید کلریدریک، سود و مواد لازم جهت محیط کشت بودند.

دستگاهها و وسایل: دستگاهها شامل: اتوکلاو، انکوباتورهای قابل تنظیم عوامل محیطی، اتاقک مجهز به لامپ فرابنفش (UV)، اتاقک کشت[1]، pH متر، همزن مغناطیسی، هیتر، ترازوهای حساس (با حساسیت‌های ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۰۱ گرم)، پیپتور، یخچال و فریزر. وسایل شامل: پنس، اسکالپل کاشی، مسواک، انواع پتری دیش، ارلن، مزور، پیپت، بالن و بشر، آلومینیوم، فویل، تیغ، دستکش یکبار مصرف، چراغ الکلی، پنبه و تنزیب بودند.

۳-۳- **محیط کشت** چون محیط کشت MS در مورد بسیاری از گیاهان چوبی پاسخ مساعدی داده است و محیط OM که روجینی (۱۹۸۴) اختصاصاً برای کشت بافت زیتون پیشنهاد کرد، مناسبترین محیطها تشخیص داده شدند، در مراحل مختلف کشت، استقرار و اندام‌زایی از این دو محیط پایه با تغییر بعضی از عوامل و افزودن هورمونها (با توجه به اندام‌زایی مورد نظر) استفاده شد (جدولهای شماره ۱ و ۲). هر دو

1 - Laminar air flow cabinet

محیط شامل عناصر غذایی کم‌مصرف و پرمصرف، یک منبع کربن، افزودنیهایی نظیر ویتامینها، هورمونهای گیاهی، آمینواسیدها، الکلهای قندی، یک کلیتد (EDTA) و یک عامل جامدکننده می‌باشند. اکثر مواد محیط OM شبیه محیط MS است، اما با اندکی تفاوت در مقدار آنها و به علاوه موادی مانند: بیوتین، گلوتامین، فولیک اسید و کلرور پتاسیم دارد که در جدول محیط کشت MS وجود ندارد. این دو محیط کشت در جدول شمارهٔ ۳ مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

۱-۳-۳- ***تهیه محلولهای مادر*** (Stocks): برای تهیه محلولهای مادر محیط کشت OM عناصر پرمصرف با هم و عناصر کم‌مصرف با هم مخلوط شدند، ولی در مورد محیط کشت MS نمکها با بنیان مشابه با هم مخلوط شدند. میزان کلیتد آهن هر دو محیط یکسان بود، به همین سبب از یک محلول مادر آهن استفاده شد. در مورد هر دو محیط کشت ارگانیکها با هم مخلوط و طوری در نظر گرفته شد که به ازای هر لیتر محیط کشت یک ویال حاوی ۵cc ارگانیک استفاده شود. تنها میواینوزیتول هر بار که محیط کشت ساخته می‌شد به صورت تازه مورد استفاده قرار می‌گرفت. محلولهای مادر عناصر ماکرو و میکرو که مطابق جدول شمارهٔ ۱ تهیه گردیدند در شرایط یخچال (+۴°C)، و ارگانیکها در دمای ۱۸°C- نگهداری می‌شدند. میزان قند و آگار مصرفی هر دو محیط یکسان و به ترتیب ۶ و ۳۰ گرم در لیتر بودند. pH هر دو محیط در سطح ۵/۸ تنظیم گردید. کلیهٔ مواد محیط کشت در آب محلول شد و مشکلی جهت تهیه محلولهای مادر وجود نداشت. در مورد محلول مادر حاوی آهن ابتدا مقادیر لازم را از هریک از عوامل (کلیتد و سولفات فرو) به‌طور جداگانه در آب دوبار تقطیر حل کرده و محلول حاوی کلیتد را تا ۶۰°C گرم نموده و محلول سولفات فرو را به تدریج به آن اضافه نموده و تا حجم نهایی (۲۵۰ میلی‌لیتر) رساندیم.

۲-۳-۳- ***تهیه محلول مادر هورمونها:*** GA_3 به سهولت در آب قابل حل است. کاینتین و BAP را ابتدا در کمی اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال حل نموده و بعد با

افزودن تدریجی آب دو بار تقطیر به حجم (۲۰۰cc) رساندیم. اکسینها (IBA و NAA) را ابتدا در کمی الکل (اتانول مطلق) حل کرده و پس از آن به تدریج با آب دو بار تقطیر به حجم رساندیم. از آنجا که با افزودن سریع آب مقطر، محلول کدر شده و کریستال تشکیل می‌شد در مراحل بعد جهت سهولت کار از سود نرمال برای حل نمودن اکسینها استفاده شد.

۳-۳-۳- *تهیه محیط کشت*: به هدف تهیهٔ محیط کشت ابتدا کلیه محلولهای مادر را به مدت یک ساعت در شرایط آزمایشگاه قرار داده تا از نظر دما به تعادل برسند. موادی که می‌بایست به صورت تازه اضافه شوند (ساکارز و میواینوزیتول) به مقدار متناسب با حجم محیط کشت حل نموده و کلیهٔ عناصر ماکرو و میکرو ارگانیکها را به آن اضافه نمودیم و قبل از افزودن مقدار مورد نیاز هورمون (با توجه به مرحله رشدی و اندام‌زایی مورد نظر) محلول را به نصف حجم نهایی رسانده و با توجه به تعداد تیمارهای هورمونی، آن را تقسیم و پس از اضافه کردن هورمون آن را به حجم نهایی رساندیم. pH محیط را با استفاده از سود یا پتاس ۰/۵ نرمال و اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال در سطح ۵/۸ تعدیل کرده و پس از افزودن آگار، روی صفحه داغ تا شفافیت کامل حرارت دادیم. محیط کشت را در ارلنهای ۱۲۵cc یا ویالهای شیشه‌ای ۲۰cc تقسیم و در اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱C و فشار ۱/۵ اتمسفر سترون کردیم. همراه محیط کشت کلیهٔ وسایل مورد استفاده جهت کشت نیز در اتوکلاو سترون شده و تا زمان مصرف در اتاقک UV نگهداری می‌شدند.

جدول شمارهٔ ۱ - ترکیب، نحوهٔ تهیه و شرایط نگهداری محیط کشت پایه OM

(محیط اختصاصی زیتون روجینی، ۱۹۸۴)

ماده	میلیگرم در لیتر	میلیگرم در استاک	مقدار لازم از استاک برای یک لیتر محیط	شرایط نگهداری
		در لیتر		
KNO3	1100	22000		
NH4NO3	412	8240		
Ca(No3)2. 4H2O	600	12000	50ml	+4°C
MgSo4. 7H2O	1500	30000		
CaCl2. 2H2O	440	8800		
KH2PO4	340	6800		
KCL	500	10000		
		در ۲۵۰ میلی‌لیتر		
MnSo4, 4H2O	22.3	557.5		
ZnSo4. 7H2O	14.3	357.5		+4°C
CuSo4.5H2O	0.25	6.25	10ml	
KI	0.83	20.75		
CoCl2, 6H2O	0.025	0.625		
H3Bo3	12.4	310		
Na2MoO4, 2H2O	0.25	6.25		
		در ۲۵۰ میلی‌لیتر	10ml	+4°C
FeSo4, 7H2O	27.8	695		
Na2EDTA	37.5	937.5		
		در ۲۵۰ میلی‌لیتر		
Nicotinic acid	5	125		
Pyridoxin. HCL	0.5	12.5	10ml	+20°C
Thiamin. HCl	0.5	12.5		
Biotin	0.05	1.25		
Folic acid	0.5	12.25		
Glycine	2	50		
		-	تازه وارد می‌شود	
Myo-inositol	100	-	پس از تعدیل pH	
Glutamin	2190	-	اضافه می‌شود	
Sucrose	30000	-		
Agar	6000			

- pH محیط با HCl و OHNa نیم‌نرمال به ۵/۸ تعدیل یافت.
- هورمونهای محیط کشت شامل BAP، IBA و NAA بودند.

جدول شمارهٔ ۳- مقایسهٔ محیط کشتهای مناسب جهت کشت بافت زیتون (MS, OM)

مواد تشکیل دهنده	محیط OM (میلیگرم در لیتر)	محیط MS (میلیگرم در لیتر)
KNO3	1100-	1900
NH4NO3	412-	1650
Ca(NO3)2, 4H2O	600++	-
CaCl2. 2H2O	440:	440
KCl	500++	-
MgSo4. 7H2O	1500+	370
KH2Po4	340-	170
FeSo4, 7H2O	27.8:	27.8
Na2EDTA	37.5:	37.5
MnSo4. 4H2O*	22.3+	19.9
H3BO3	12.4+	6.2
ZnSo4. 7H2O	14.3+	8.6
Na2MoO4, 2H2O	0.25:	0.25
CuSo4. 5H2O	0.25+	0.025
CoCl2. 6H2O	0.025:	0.025
Kl	0.83:	0.83
Myo-inositol	100:	100
Glycine	2:	2
Thiamine.HCl	0.5+	0.1
Pyridoxin.HCl	0.5:	0.5
Nicotinic acid	5+	0.5
Biotin	0.05++	-
Folic acid	0.5++	-
Sucrose	30000:	30000
Glutamine	2190++	-
Agar	6000-	8000
[pH]	[5.8]:	[5.8]

- علامتهای - و + مقایسه مواد را در دو محیط کشت نشان می‌دهند.
- علامتهای ++ وجود ماده در محیط OM و عدم آن را در محیط MS نشان می‌دهند.
* در مورد محیط MS از MnSo4. 2H2O استفاده شد که با محاسبه آب تبلور مقادیر یکسانند

۴-۳- ***سترون‌سازی ریزنمونه‌ها:*** به منظور سترون‌سازی ریزنمونه‌ها با توجه به زمان، محل برداشت و حالت فیزیولوژیکی نمونه‌های گیاهی تیمارهای مختلف

سترون‌سازی اعمال گردید.

عوامل مورد استفاده شامل: بنومیل ۱٪، اتیل الکل، کلرور مرکوریک و هیپوکلریت سدیم بودند که در زمانهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. به سبب وجود آلودگیهای باکتریایی درونی در نهایت به اجبار از آنتی‌بیوتیک در داخل محیط کشت نیز استفاده vndn. ضدعفونی نمونه‌ها با تکان دادن آنها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول بنومیل ۱٪ حاوی چند قطره مایع پاک کننده آغاز شد. پس از آن با مایع ظرفشویی و اتانول ۷۰٪ به‌طور جداگانه مسواک‌کشی شده و پس از هر مرحله در جریان مداوم آب قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به قطعات کوچک شامل یک گره دو جوانه‌ای و یا یک جوانه انتهایی تقسیم شدند. تیمارهای اصلی ضدعفونی در شرایط هوای پالایش شده اتاقک کشت بر ریزنمونه‌ها اعمال شد. کلرور مرکوریک با غلظتهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد در مدت زمانهای ۲، ۴ و ۶ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱٪ (سفیدکننده تجارتی ۲۰٪ حجمی) در مدت زمانهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه و نیز تلفیقی از دو عامل مذکور به کار گرفته شدند و در هر مرحله ضدعفونی آبکشی نمونه‌ها با آب دو بار تقطیر استریل انجام شد. چون حذف بقایای کلرور جیوه به سختی قابل انجام است، تعداد دفعات شستشو در مورد نمونه‌هایی که تحت تأثیر این تیمار قرار گرفتند به ۴ مرتبه افزایش یافت.

در مواردی که نمونه‌های نخستین به مدت طولانی در یخچال نگهداری می‌شدند، استفاده از قارچ‌کش در هنگام ورود نمونه‌ها به آزمایشگاه باعث افزایش آلودگی بعدی و لیز شدن نمونه‌ها می‌شد. به همین سبب همواره سعی شد این عامل تنها قبل از اعمال تیمارهای اصلی ضدعفونی بکار گرفته شود.

۵-۳- *کشت و استقرار ریزنمونه‌ها:* پس از آخرین مرحلهٔ سترون‌سازی، ریزنمونه‌ها در شیشه‌های سترون شده نگهداری شده و در مرحلهٔ اول به منظور استقرار در دو محیط کشت پایه MS و OM کامل با مقادیر کم BA (۰/۵-۰/۲ ppm) قرار گرفتند.

۶-۳- *شاخه‌زایی:* نمونه‌های مستقر شده جهت تحریک شاخه‌زایی در همان دو محیط پایه با افزایش تدریجی BA زیرکشت قرار گرفتند. پس از ظهور شاخه‌ها و رشد طولی مطلوب آنها، هر شاخساره به قطعات ۲Cm-۱ تقسیم شده و به هدف پرآوری شاخه در محیط MS کامل حاوی BA (۰/۵ تا ۳ میلیگرم در لیتر) منتقل شدند. در این مرحله اغلب در قاعده نمونه‌ها مقداری کالوس تشکیل می‌شد که در هر زیرکشت این کالوسها حذف می‌شدند تا از رشد احتمالی جوانه‌های نابجا از توده سلولی جلوگیری شود. عملیات زیرکشت هر سه الی چهار هفته انجام می‌شد و در پایان هر مرحلهٔ زیرکشت کلیه تغییرات ایجاد شده نظیر محیط کشتها و غلظت هورمونهای مصرفی، تعداد و طول اندام، ضریب ازدیاد، شرایط فیزیولوژیکی نمونه‌ها، شادابی و رنگ برگها، وجود و مقدار کالوس تشکیل شده و... یادداشت‌برداری می‌شدند.

در هر مرحله، متناسب با رشد و اندام‌زایی، غلظت هورمونهای محیط کشت تغییر می‌یافت و پس از مشاهده اثرات نامطلوب آنها با حذف یا تغییر نوع هورمون از ظهور عوارض نامطلوب جلوگیری می‌شد.

پس از تولید تعداد کافی شاخه، نمونه‌ها، یک مرحله در محیط کشت فاقد هورمون زیرکشت رفتند و پس از ۳-۲ هفته به محیط ریشه‌زا منتقل شدند.

۷-۳- *ریشه‌زایی:* شاخساره‌های ایجاد شده پس از یک دوره نگهداری در محیط پایه، به هدف تحریک ریشه‌زایی به محیط کشت ریشه‌زا که همان دو محیط قبلی با کاهش غلظت نیترات آنها به نصف و افزودن مقادیر مختلفی از NAA یا IBA (غلظتهای ۰/۱ تا ۳ میلیگرم در لیتر) بود منتقل شدند. در مرحلهٔ اول ریشه‌زایی کلیه نمونه‌ها به مدت یک هفته در تاریکی مطلق قرار گرفتند و پس از آن به دورهٔ نوری ۸-۱۶ ساعته منتقل شدند. به سبب اثرات نامطلوب NAA در تولید ریشه‌های کوتاه، قطور، شکننده و اغلب پودی شکل که از محیط کشت خارج می‌شدند، این هورمون، حذف و عملیات با IBA تنها، در محیط کشت MS ادامه یافت که پاسخ مطلوبتری در این مرحله

از اندام‌زایی نشان داد.

۸-۳- ***شرایط نگهداری:*** در مرحلهٔ استقرار، نمونه‌ها در ویالهای شیشه‌ای کوچک حاوی ۱۰CC-۵ محیط کشت (در هر ویال یک نمونه) مستقر شده و در اتاقک رشد با دورهٔ نوری ۸-۱۶ و تناوب دمایی ۱۵-۲۵ و شدت نور حدود ۸۰۰۰ لوکس (تهیه شده توسط لامپهای فلورسنت) قرار گرفتند.

در مرحلهٔ شاخه‌زایی نمونه‌های مستقر شده فعال در ارلنهای حاوی ۵۰CC محیط کشت (در هر ارلن ۴-۳ نمونه) کشت شده و در همان شرایط فوق قرار گرفتند.

در مرحلهٔ ریشه‌زایی شاخساره‌ها پس از اینکه از محیط پایه به محیط ریشه‌زا منتقل شدند به مدت یک هفته در انکوباتورهایی با دمای ثابت ۲۰C و تاریکی مطلق قرار گرفته و پس از آن به اتاقک رشد با شرایط قبلی منتقل شدند. نمونه‌های ریشه‌دار شده پس از حذف آگار بوسیله جریان آب در گلدانهای حاوی پرلیت، ورمیکولیت، شلتوک و ماسه بادی (۱:۱:۱:۱ حجمی) منتقل شده و با پوشش شیشه‌ای یا پلاستیکی به‌طور کامل پوشیده شدند. گیاهچه‌ها در هفته اول انتقال با محیط کشت مایع MS رقیق شده (۱/۱۰) فاقد ساکارز آبیاری شده و گلدانها در ژرمیناتورهایی با دورهٔ نوری ۸-۱۶ ساعت و تناوب دمایی ۱۵C-۲۵ و رطوبت نسبی ۷۰٪ قرار گرفتند. پس از یک هفته به تدریج شروع به سوراخ کردن پوشش گلدانها نموده تا پس از گذشت حدود یک ماه که پوشش به‌طور کامل حذف گردید.

۴- نتایج

نمونه‌برداری در فصول مختلف نشان داد که به سبب آلودگی قارچی به ویژه در نمونه‌های حمل شده از مناطق طارم و رودبار، مناسبترین زمان جهت تهیه جوانه اواسط پاییز است. اگرچه در این زمان نیز شدت آلودگی قارچی همچنان زیاد است ولی مقاومت جوانه‌ها در مقابل عوامل سترون‌ساز بیشتر بوده و به سهولت می‌توان با حفظ

جوانه‌ها، قارچها را زایل نمود، ولی در مورد حذف باکتریهای درونی مشکل همچنان باقی است.

نتایج بدست آمده از سترون‌سازی جوانه‌ها نشان دادند که مناسبترین تیمار سترون‌ساز به ویژه درخصوص نمونه‌های برداشت پاییزه مرکوریک کلراید ۰/۱٪، به مدت دو دقیقه است. این تیمار در مورد جوانه‌های برداشت بهاره به‌طور کامل نامناسب بود، در حالی که استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱٪ (سفیدکننده تجارتی ۲۰٪ حجمی) به مدت ۱۵ دقیقه در مورد این گونه جوانه‌ها نتیجه بهتری داد. تلفیق دو عامل سترون‌ساز (هیپوکلریت سدیم ۱٪ و مرکوریک کلراید ۰/۱٪ به ترتیب در مدت زمانهای ۱۰ و ۲۰ دقیقه) نیز تنها در مورد نمونه‌های برداشت پاییزه و زمستانه نتیجه ضعیفی در برداشت (نمودار شمارهٔ ۱). مشاهدات حاصل از اثر عوامل سترون‌ساز بر رفع آلودگی ریزنمونه‌های زیتون در جدول شمارهٔ ۴ خلاصه شده است.

استفاده از قارچ‌کش قبل از اعمال تیمارهای اصلی سترون‌ساز تفاوت چشمگیری در حذف آلودگیهای قارچی نشان نداد و نتایج حتی در مواردی که نمونه‌ها پس از کاربرد قارچ‌کش (بنومیل) برای استفاده بعدی در یخچال نگهداری می‌شدند به‌طور کامل منفی بود. پیش‌تیمارهای کاربرد اتانول و شستشو در جریان مداوم آب قبل از اعمال تیمارهای اصی سترون‌سازی نتایج قابل قبولی دادند. کاربرد اتانول ۷۰٪ به صورت مسواک‌کشی و شستشوی سریع، مناسبتر از عمل دیپ (غوطه‌ورسازی سریع) بود.

مناسبترین تیمار جهت حذف آلودگیهای باکتریایی کاربرد کربنی سیلین با غلظت ۳۰۰ppm بود، ولی این تیمار نیز تا وقتی که آنتی‌بیوتیک در محیط وجود داشت، از رشد باکتریها جلوگیری می‌کرد و به محض حذف آن رشد باکتریها دوباره ادامه می‌یافت. از طرفی ریزنمونه‌هایی که تحت تأثیر این تیمار قرار داشتند از رشد و نمو مطلوبی برخوردار نبودند. از روشهای دیگری که جهت حذف آلودگی باکتریایی درونی به کار گرفته شد، تنها کاربرد نوک جوانه انتهایی و زیرکشت سریع در مراحل اولیه استقرار

موفق بود که در این روش نیز نمونه‌ها از سرعت رشد مطلوبی برخوردار نبودند. از مجموع پایه‌هایی که در مراحل مختلف این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند تنها پایه ماری موجود در سازمان تحقیقات کشاورزی گرگان و گنبد آلودگی به نسبت کم و قابل کنترلی داشت. خوشبختانه نمونه‌های گرفته شده از واریته‌های ماری موجود در ایستگاه تحقیقات زیتون رودبار و همچنین پایه‌های ماری کاشته شده در باغ میوه مؤسسه محل تحقیق نیز نسبت به سایر پایه‌های مورد بررسی آلودگی باکتریایی کمتری نشان دادند. اگرچه اغلب پایه‌های مورد بررسی آلودگی باکتریایی درونی داشتند، ولی مشاهدات ظاهری حاکی از عدم تأثیر منفی آنها بر رشد و نمو و تولید گیاه بود.

همان‌طور که اشاره شد مناسبترین روش حذف آلودگی که در پژوهش حاضر نتیجه قابل قبولی داد استفاده از نوک جوانه‌های انتهایی و زیرکشتهای سریع در مراحل اولیه کشت و استقرار بود. با این روش موفق به تولید شاخساره‌های عاری از آلودگی شدیم که پس از اعمال تیمارهای ریشه‌زایی گیاهچه‌های تولید شده به گلدان منتقل شدند.

محیط کشت مطلوب در مرحلهٔ استقرار نمونه‌ها محیط OM کامل حاوی ۰/۵ppm هورمون BAP بود، ولی کاربرد این محیط جهت شاخه‌زایی نتیجه خوبی نداد. در این مرحله محیط کشت MS موفق‌تر نشان داد و غلظت بهینه BAP در مورد شاخه‌زایی ۱ppm بود (نمودار شمارهٔ ۱). نکته جالب توجه شاخه‌زایی ریزنمونه‌های برداشت زمستانه در غلظتهای پایین BAP (۰/۲۵ و ۰/۵ میلیگرم در لیتر) بود، درحالی که معدود نمونه‌های تثبیت شده بهاره به این غلظتهای کم سیتوکنین پاسخ مثبتی نداده و با افزایش غلظت این هورمون به ۲ppm شاخه‌زایی کردند (نمودار شمارهٔ ۱). بیشترین میانگین تعداد شاخه تولید شده به ازای هر نمونه (میانگین ۴ تکرار ۵ واحدی) ۲/۸ بود که در نتیجه کاربرد ۱ppm از BAP مشاهده شد (جدول شمارهٔ ۵). در مرحله شاخه‌زایی هنگامی که به جای افزایش BAP، به همان میزان 2ip مصرف شد، اثرات

توأم آنها از اثر BAP به تنهایی مناسبتر بود.

در مورد ریشه‌زایی شاخساره‌های آزمایشگاهی، نتایج نشان دادند که شاخساره‌های بدست آمده از ریزنمونه‌های برداشت پاییزه و زمستانه به نسبت موفق بودند و غلظت بهینه اکسین (IBA) در این مورد ۰/۵ppm در مورد نمونه‌های برداشت زمستانه و ۱ppm برای نمونه‌های برداشت پاییزه بود. هیچیک از نمونه‌های برداشت بهاره در مرحله ریشه‌زایی موفق نبودند (نمودار شماره ۲). در این بررسی غلظتهای ۰/۱ تا ۳ میلیگرم در لیتر IBA در مرحله ریشه‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر بیشتر از ۲ میلیگرم در لیتر این هورمون اثرات نامطلوبی نشان داد و علاوه بر تولید کالوس در قاعده شاخساره‌ها، موجب کاهش رشد و ریزش برگ آنها نیز می‌شد. این نارسایی‌ها با استفاده از 2,4-D در غلظتهای کمتر نیز مشاهده شد (۱ppm-۰/۵) جدول شمارهٔ ۸ اثر غلظتهای مختلف IBA بر ریشه‌زایی شاخساره‌های آزمایشگاهی آورده شده است.

محیط مطلوب ریشه‌زایی MS با نصف غلظت نیترات بود و مناسبترین مقدار و نوع اکسین مصرفی، ۱-۰/۵ میلیگرم در لیتر IBA بود. اعمال یک دوره تاریکی یک هفته‌ای جهت تحریک ظهور ریشه‌ها، در مرحله اول ریشه‌زایی ضروری بود، ولی باقی ماندن در تاریکی به مدت بیشتر باعث پژمردگی و ریزش برگها و نیز کاهش شدت سبزینگی پهنک آنها می‌شد. در مرحلهٔ ریشه‌زایی غلظتهای مختلف NAA (۲ppm-۰/۵) نیز مورد بررسی قرار گرفت ولی از آنجا که در نتیجه کاربرد این اکسین ریشه‌ها بسیار ترد و شکننده و قطور شده و اغلب از محیط کشت خارج و پنبه‌ای شکل می‌شدند، به‌طوری که جابه‌جایی نمونه‌های ریشه‌دار شده به سختی قابل انجام بود، این تیمار حذف شد.

نمونه‌های ریشه‌دار شده به گلدانهای حاوی مقادیر مساوی (حجمی) از پرلیت، ورمیکولیت، شلتوک و ماسه بادی (۱:۱:۱:۱) سترون شده منتقل شدند و طی هفتهٔ اول با محیط کشت مایع MS رقیق شده (۱/۱۰) فاقد ساکارز آبیاری و پس از آن تا مدت سه

هفته، هفته‌ای یک بار تنها از ارگانیکهای رقیق شده محیط MS جهت تغذیه آنها استفاده می‌شد. در طول این مدت پوشش گلدانها به تدریج حذف شد. استفاده از پیت ماس در مخلوط بستر گلدانها در مراحل نخستین انتقال باعث ظهور آلودگی قارچی در یقه گیاهچه‌ها و حذف آنها می‌شد، به همین سبب این ماده از مخلوط بستر حذف و شلتوک جانشین آن گردید. نارسایی مذکور به ویژه در مراحل نخستین انتقال که ناگزیر از افزایش رطوبت بودیم مشکل سازتر بود. آلودگی قارچی سطح برگها در این مرحله نیز از عوامل بازدارنده بود. روش مناسب جهت فائق آمدن بر این مشکل، تهویهٔ روزانه و کاهش تدریجی رطوبت بود. خوشبختانه برگهای گیاهچه‌ها در این هنگام از پوشش اپیدرمی کافی برخوردار بوده و رنگ آنها سبز تیره بود (شکل شمارهٔ ۴). این ویژگی از عوامل مهم در سازگاری گیاهچه‌ها در مراحل نخستین انتقال بود. احتمال می‌رود که این ویژگی به سبب کاهش غلظت ساکارز در آخرین زیرکشتها باشد. زیرا با کاهش ماده آلی در محیط کشت، برگها به تدریج عمل اصلی خود را که تثبیت CO_2 است آغاز می‌کنند و روزنه‌ها نیز طی این مدت فعال شده و درنتیجه از شدت دفع آب گیاهچه‌ها کاسته شده و توان سازگاری آنها افزایش می‌یابد. همزمان بااین تغییرات در اندامهای هوایی تشکیلات آوندی ریشه‌های نابه‌جا سازمان یافته و جذب آب و املاح از این طریق آغاز می‌شود.

جدول شمارهٔ ۴- اثر عوامل سترون‌ساز بر رفع آلودگی ریزنمونه‌های زیتون در فصول مختلف

پیش‌تیمار		تیمار اصلی		نمونه‌های بهاره	نمونه‌های پاییزه	نمونه‌های زمستانه
عامل	زمان	عامل	زمان (دقیقه)			
بنومیل ۱٪ اتانول ۷۰٪	۳۰دقیقه ۵ ثانیه	کلرور مرکوریک ۰/۱٪	۲	+	++++	+++
			۴	−	+++	+
			۶	−	+	+
		هیپوکلریت سدیم ۱٪	۱۰	+	−	−
			۱۵	++	+	+
			۲۰	−	+	+
		هیپوکلریت سدیم ۱٪ کلرور مرکوریک ۰/۱٪	۱۰	−	+	+
			۲	−	+	+

++++ عالی +++ خوب ++ متوسط + ضعیف − بی‌اثر

جدول شمارهٔ ۵- مقایسهٔ میانگین اثر BAP بر شاخه‌زایی ریزنمونه‌های زیتون (برداشت پاییزه)

شماره تیمار	غلظت BAP (ppm)	میانین تعداد شاخه در هر نمونه (۴ تکرار ۵ واحدی)	میانگین طول شاخه (cm)
۱	۰/۲۵	۱/۲۵A*	۱/۲A*
۲	۰/۵	۲A	۱/۴A
۳	۱	۳A	۱/۹A
۴	۲	۲/۵A	۱/۵A
۵	۳	۲/۲۵A	۰/۹A
۶	۴	۱/۵A	۱/۲A

* مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن پس از تبدیل داده‌ها به $\sqrt{X + 0/5}$ در سطح ۵٪ = α انجام شده است.

جدول شمارهٔ ۶- تجزیه و تحلیل واریانس اثر BAP بر شاخه‌زایی نمونه‌های زیتون

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
تیمار	۵	۰/۸۸۱	۰/۱۷۶	۰/۶۴۸ns
خطای آزمایشی	۱۸	۴/۸۹۱	۰/۲۷۲	
کل	۲۳	۵/۷۷۱		

جدول شمارهٔ ۷- تجزیه و تحلیل واریانس اثر BAP به افزایش طول شاخساره‌های آزمایشگاهی زیتون

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
تیمار	۵	۰/۳۲۵	۰/۰۶۵	۰/۳۴۰ ns
خطای آزمایشی	۱۸	۳/۴۴۴	۰/۱۹۱	
کل	۲۳	۳/۷۶۹		

جدول شمارهٔ ۸- مقایسهٔ میانگین اثر IBA بر ریشه‌زایی شاخساره‌های آزمایشگاهی زیتون

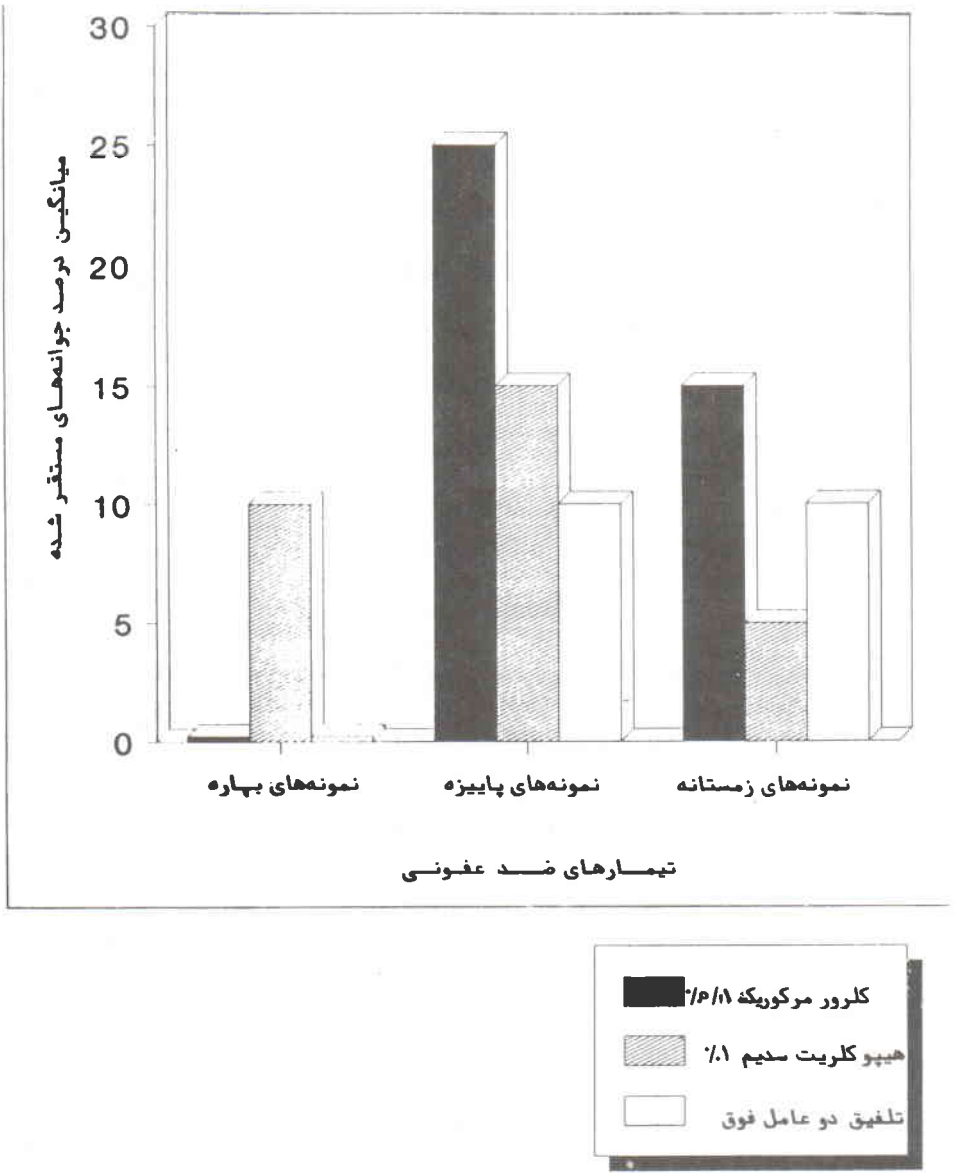
شماره تیمار	غلظت BAP (ppm)	میانین تعداد شاخه در هر نمونه (۴ تکرار ۵ واحدی)	میانگین طول شاخه (cm)
۱	۰/۱	۰/۲۵A	۰/۳B
۲	۰/۲۵	۰/۷۵A	۰/۳B
۳	۰/۵	۱/۲۵A	۱/۹AB
۴	۱	۲/۲۵A	۲/۱A
۵	۲	۲A	۱/۲AB
۶	۳	۱A	۱/۱AB

میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند دارای اختلاف معنی‌دار نبوده و در یک دسته قرار می‌گیرند.

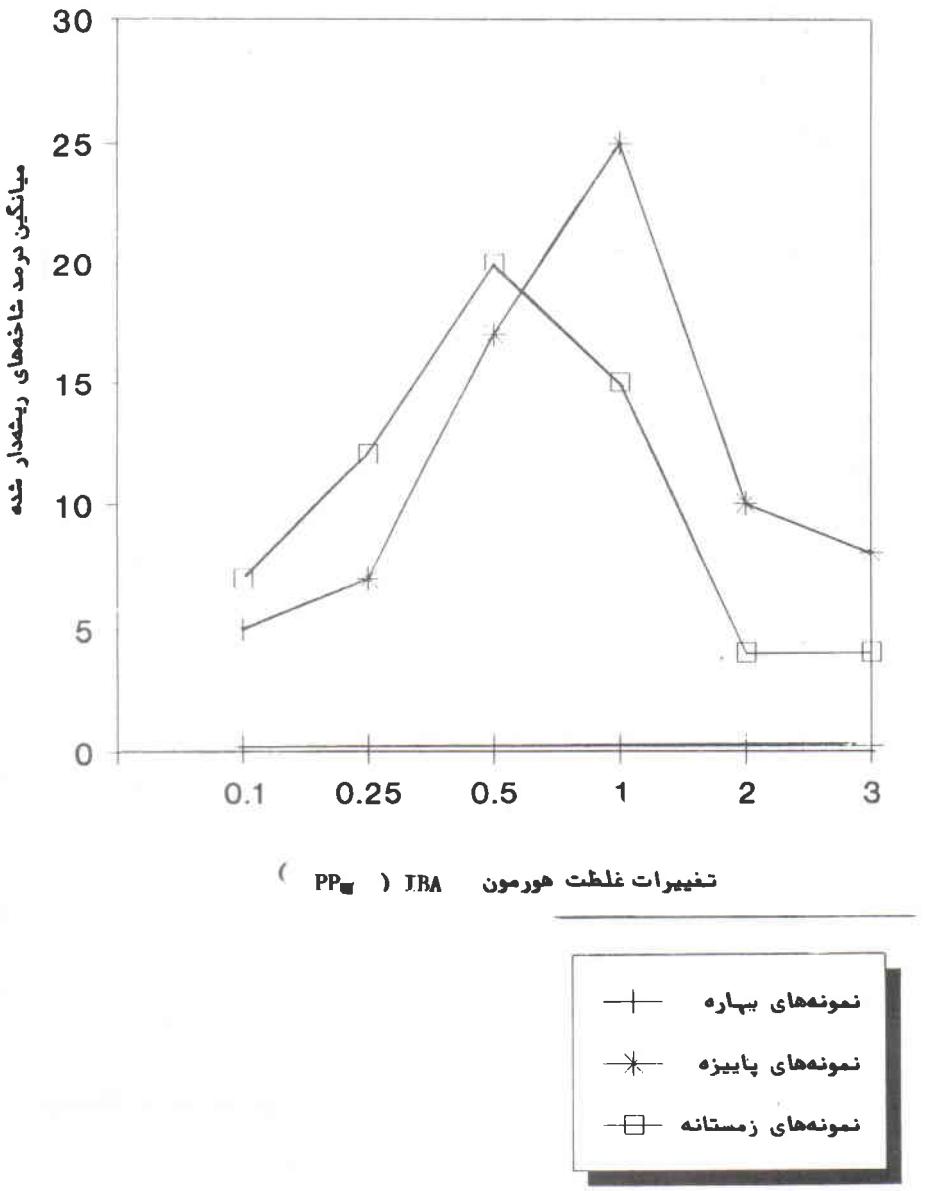
جدول شمارهٔ ۹- تجزیه واریانس اثر IBA بر ریشه‌زایی (تعداد ریشه به ازای نمونه) شاخساره‌های زیتون

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی DF	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
تیمار	۵	۱/۶۲۲	۰/۳۲۴	۱/۴۴۹ ns
خطای آزمایشی	۱۸	۴/۰۲۹	۰/۲۲۴	
کل	۲۳	۵/۶۵۲		

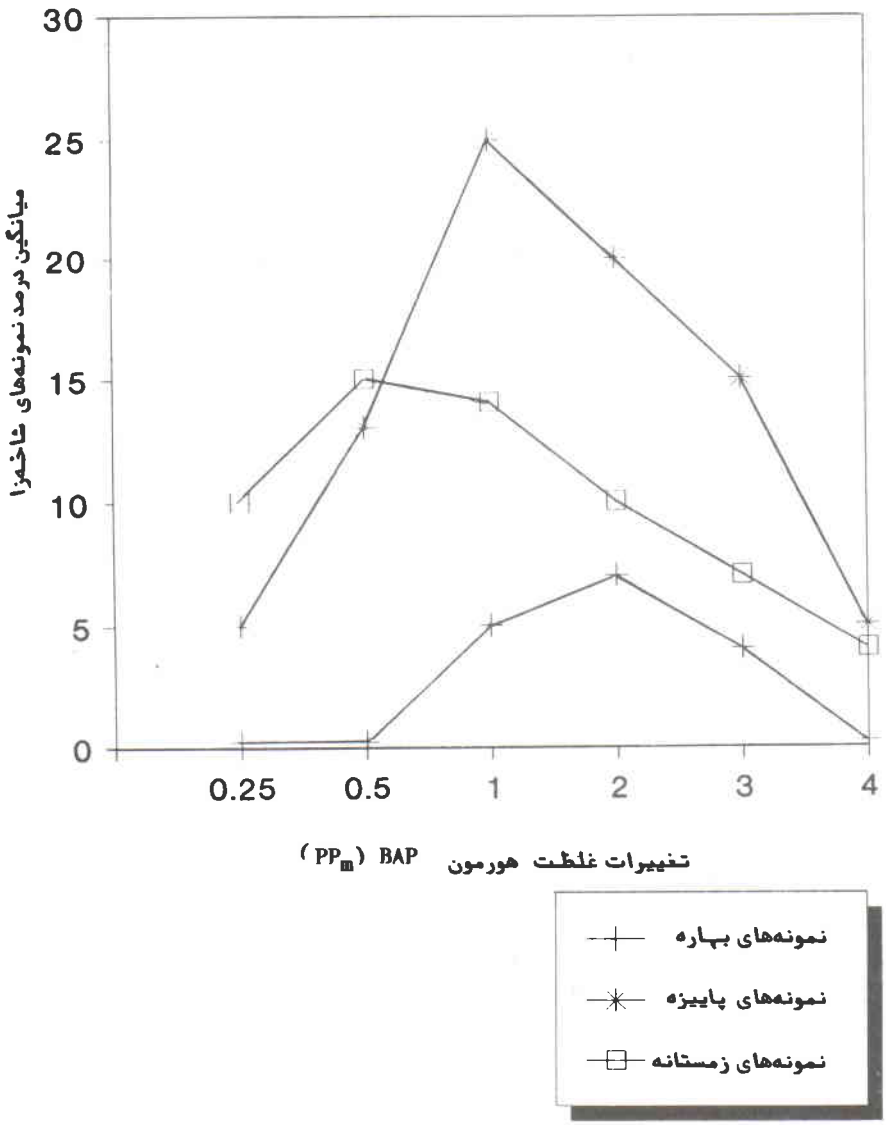
نمودار شمارهٔ ۱ - میانگین درصد جوانه‌های مستقر شده زیتون در سه برداشت بهاره، پاییزه و زمستانه در محیط کشت OM در نتیجه اعمال تیمارهای سترون‌سازی.

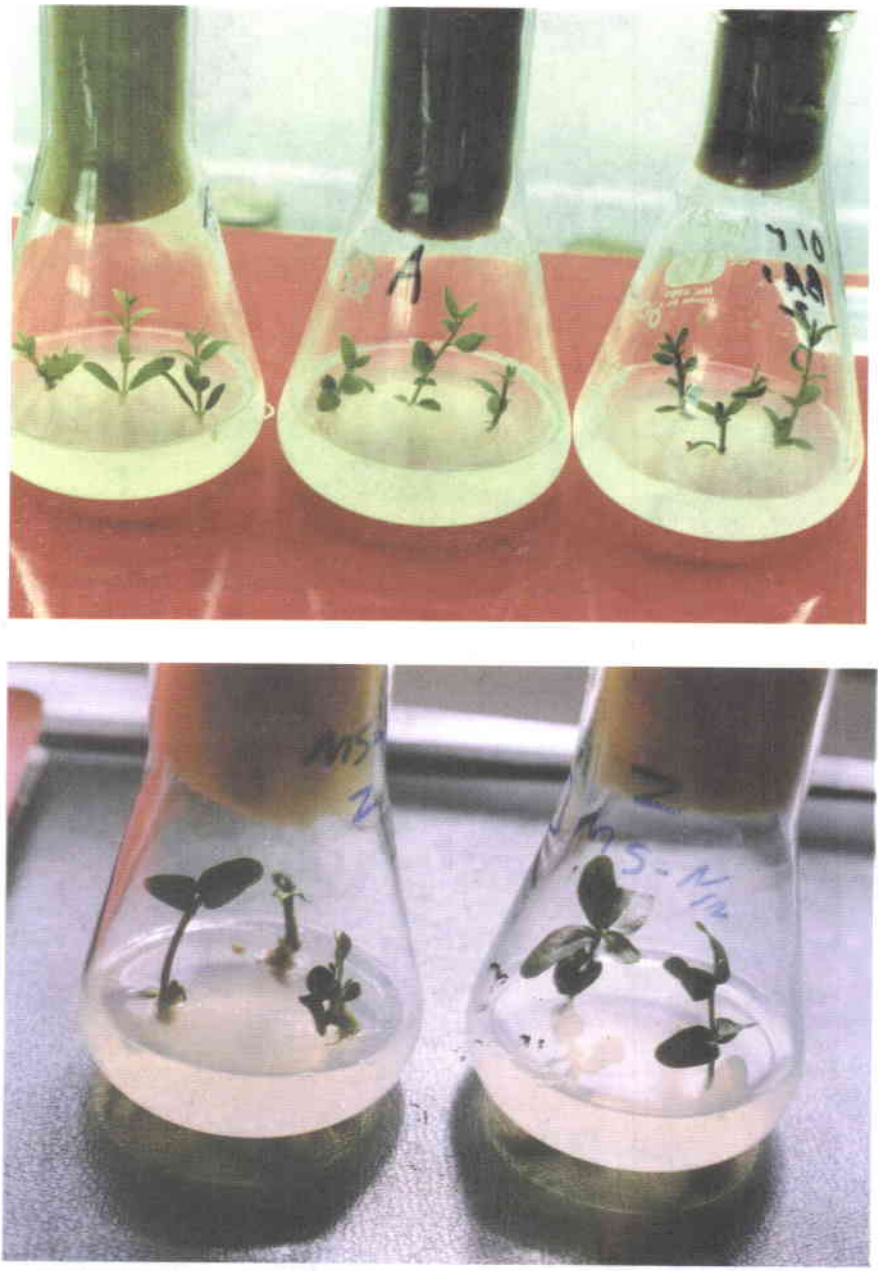


نمودار شمارهٔ ۲- پاسخ ریشه‌زایی شاخه‌های آزمایشگاهی زیتون به غلظتهای مختلف IBA در محیط کشت MS N/2



نمودار شمارهٔ ۳- پاسخ شاخه‌زایی ریزنمونه‌های مستقر شده زیتون در برداشتهای بهاره، پاییزه و زمستانه به غلظتهای مختلف BAP روی محیط کامل MS.





شکل شمارهٔ ۱ - شاخه‌زایی و تکثیر شاخه زیتون در شرایط درون‌شیشه در محیط کشت حاوی BAP

شکل شمارهٔ ۲- تشکیل کالوس در قاعده شاخساره‌های زیتون و نارسایی برگی بر اثر کاربرد 2,4-D و غلظتهای زیاد IBA (بیش از ۲ppm)

شکل شمارهٔ ۳- ریشه‌زایی شاخساره‌های زیتون در محیط کشت MS N/2 حاوی IBA

شکل شمارهٔ ۴- مراحل سازگاری گیاهچه‌های آزمایشگاهی زیتون در شرایط گلدانی

شکل شمارهٔ ۵-گیاهچه سازگار شده در گلدان (چپ)، و رشد سریع همان گیاهچه پس از انتقال به گلخانه (راست).

بحث

در روش تکثیر در شرایط آزمایشگاه، جوانه‌ها و قطعات گره حامل آنها مناسبترین منبع جهت همگروه‌سازی با هدف حفظ ژنوتیپ پایه مادری است، چراکه این اندامها با گذراندن یک مرحله تمایزی از نظر فیزیولوژی تخصصی شده و توان حفظ ویژگیها را خواهند داشت. با این حال، اگر در طول دوره کشت به ویژه در غلظتهای خاصی از اکسینها و بیشتر موقعی که همزمان با سیتوکنینها مصرف می‌شوند، در قاعده نمونه‌ها کالوس تشکیل شود، این کالوس به شدت اندام‌زا است، ولی اندامهای حاصل از آن تنوع سوماکلونالی خواهند داشت که با هدف همگروه‌سازی مغایر است، به همین سبب باید از تیمارهایی که به تشکیل کالوس منجر می‌شوند جلوگیری کرده و یا در هنگام زیرکشت آن را به‌طور کامل حذف نمود. متأسفانه در بررسی منابع متوجه شدیم که دربارهٔ کشت بافت زیتون، ریزنمونه‌های نخستین جهت کشت طوری انتخاب شده‌اند که نمی‌توان به حفظ صفات ژنتیکی پایه مادری آنها اطمینان داشت و یا نمونه‌های نخستین از گیاهچه‌هایی انتخاب شده‌اند که نمی‌توان به حفظ صفات ژنتیکی پایه مادری آنها اطمینان داشت و یا نمونه‌های نخستین از گیاهچه‌هایی انتخاب شده‌اند که هنوز توان بالقوهٔ ژنتیکی آنها مشخص نشده است (در مواردی که از دانه‌رستها یا گیاهچه‌های آزمایشگاهی که نمونه نخستین آنها غیر از جوانه انتخاب شده، به عنوان گیاه مادر استفاده شده است). از طرفی کاناز و همکاران (۱۹۸۸) معتقدند که به سبب سرعت اکسیداسیون مریستمهای جمع‌آوری شده از گیاهان رشد یافته در مزرعه و گلخانه، کشت آنها جهت تکثیر موفق نخواهد بود، ولی مریستمهای برگرفته از شاخه‌های رشد یافته در شیشه، نمونه‌های موفقی هستند (۱۸). محققان مذکور توصیه کرده‌اند که کشت نیمه سترون غده‌بن زیتون در ورمیکولایت منبع مناسبی جهت تکثیر آزمایشگاهی زیتون محسوب می‌شود. با کشت این غده‌بن‌ها پس از یک دوره تأخیر ۱۵-۱۰ روزه تعداد

زیادی جوانه فعال شده و رشد می‌کنند.

چنین جوانه‌هایی پس از یک ماه به گیاهچه‌های قابل انتقال تبدیل می‌شوند (۱۵).

تکثیر زیتون به وسیله بذر به دلایلی چون: مشکل جوانه‌زنی که به طور عمده به سبب سختی پوسته و حضور بازدارنده‌ها به ویژه در آندوسپرم و آلبومن آن است، طولانی بودن دورهٔ جوانی (۱۵-۱۰ سال) و نیز عدم ثبات ژنتیکی، اهداف تکثیرکنندگان را برآورده نمی‌کند. پیوند زدن آن نیز چندان معمول نیست. در حال حاضر مناسبترین روش تکثیر رویشی زیتون قلمه‌زنی است که آن هم در مورد کولتیوارهای سخت ریشه‌زا نمی‌تواند روش مطلوبی باشد. در آزمونی که با استفاده از اگروباکتریوم ریزوژنز (سوش A4) به هدف ریشه‌زایی شاخساره‌های زیتون در محیط کشت نیمه‌قوی OM فاقد هورمون انجام شد، مشخص گردید که بدین روش ریشه‌زایی شاخساره‌ها افزایش می‌یابد (روجینی ۱۹۹۸. سوش ۱۵۵۸ این باکتری در حضور پوترسین در محیط کشت فاقد اکسین درصد ریشه‌زایی را افزایش داده است. به سبب وجود باکتریهای درونی در نمونه‌های زیتون کاناز و همکاران (۱۹۸۸) ملزم به استفاده از کربنی سیلین در محیط القای ریشه فاقد اکسین شدند. آنها متوجه شدند که غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر این آنتی‌بیوتیک غلظت مناسبی است. در بررسی حاضر نیز آنتی‌بیوتیک مذکور با غلظتهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلیگرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت که غلظت ppm ۳۰۰ آن باعث کنترل باکتری شد، ولی با توجه به اینکه حذف آنتی‌بیوتیک باکتری دوباره ظاهر می‌شد و از طرفی حضور مداوم آنتی‌بیوتیک رشد نمونه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌داد این تیمار ادامه نیافت. ویتزا و همکاران (۱۹۸۸) اظهار داشتند که محیط کشت MS حاوی نصف نیترات در مرحله قبل از ورود به ریشه‌زایی محیط بسیار مناسبی است و شاخه‌های بسیار قوی تولید می‌کند که پاسخ مطلوبی به ریشه‌زایی می‌دهند. این

محیط در مقایسه با محیط‌های هلر و لپویور بسیار مناسبتر تشخیص داده شد (۱۵). همین محققان در بررسی خود جهت تکثیر آزمایشگاهی گونه‌های مختلف شاه‌بلوط متوجه شدند که محیط MS و حتی ۱/۲ نیترات آن محیط مناسبی جهت تکثیر شاخه این گونه نیست، زیرا باعث گوشتی و شیشه‌ای شدن نمونه‌ها پس از تکرار زیرکشتها می‌شود (۱۸). به رغم اینکه اکثر محققان کشت بافت زیتون محیط OM را مناسب می‌دانند، ولی در پژوهش حاضر مشخص شد که این محیط تنها در مرحله استقرار نمونه‌ها مناسب است، در حالی که در مراحل شاخه‌زایی و ریشه‌زایی به ترتیب محیطهای MS و ۱/۲ نیترات آن نتیجه قابل قبولی دادند.

اگرچه در بررسی‌های آماری در هیچ‌یک از مراحل اندام‌زایی، کاربرد هورمونها اثر معنی‌داری در سطح ۵٪=a نشان ندادند، ولی در بررسیهای مشاهده‌ای مشخص شد که در هر دو مورد غلظت یک میلیگرم در لیتر هورمونها اثر چشمگیری بر اندام‌زایی (هم از نظر تعداد و هم از نظر رشد طولی) این گیاه داشتند. احتمال می‌رود این عدم معنی‌داری هورمون به سبب افزایش تدریجی غلظت آنها باشد. منحنیهای مربوط به هر مرحله اندام‌زایی مؤید این فکر است. به طوری که اگر بعضی از غلظتهای محدوده بهینه هورمونها (1ppm) حذف شوند اثر این غلظت مطلوب نمایانتر خواهد شد. از طرفی نباید اثر محیط قبلی را در رشد و اندام‌زایی نمونه‌ها از نظر دور داشت. برای اینکه این اثر در گذر از مرحله‌ای به مرحله دیگر اندام‌زایی به حداقل برسد یک مرحله زیر کشت در محیط پایه انجام می‌شد. در موارد معدودی مشاهده شد که شاخساره‌ها در محیط فاقد هورمون ریشه‌زایی کردند. این اندام‌زایی در مورد شاخساره‌های شاداب با رشد مناسب مشاهده گردید. احتمال می‌رود تنظیم کننده‌های درون‌زا[1] به ویژه در مورد شاخساره‌های قوی، اثر هورمونهای محیط را تحت تأثیر قرار دهند. این اثر با طولانی

1- Endogenus hormones

شدن زیرکشتها (حدود یک ماه) و با توجه به کاهش تأثیر اکسینهای مصرفی (به ویژه در معرض نور) نمایانتر خواهد شد. یادداشت برداریها نشان دادند که افراد گیاهی مختلف واکنشهای متفاوتی به یک نوع محیط کشت نشان می‌دهند. این ناهمسانی رشد و نمو را می‌توان با اختلاف در شرایط رشد و اندام‌زایی هریک از نمونه‌ها مرتبط دانست به همین سبب در مراحل مختلف اندام‌زایی در حد امکان از نمونه‌های یکسان در یک محیط مشابه استفاده شد.

تشکر و قدردانی

این بررسی بدون حمایت مالی و تجهیزاتی مؤسسه محل تحقیق امکانپذیر نبود. در طول انجام تحقیق مورد عنایت خاص استادان گرانقدر، به ویژه آقایان: دکتر میرزایی ندوشن، دکتر نادر شهاب، دکتر حسام‌زاده، دکتر علی‌اشرف جعفری، دکتر جعفری مفیدآبادی، دکتر عارفی و دکتر عسکریان قرار داشته و همواره از همکاری صمیمانه، کرامات اخلاقی و ویژگیهای معنوی آنها بهره‌مند بوده‌ام.

آقای مهندس علی سلطانی و همکاران محترم گروه کشت بافت، خانمها مهندس ایزدپناه، مهندس نراقی، مهندس شهرزاد و مهندس امام در مراحل مختلف انجام آزمایشها همکاری صادقانه‌ای داشته‌اند.

آقای مهندس رضا گل‌محمدی همکار عزیز مرکز زنجان در کلیه مراحل نمونه‌برداری از نقاط صعب‌العبور استان زنجان همکاری بی‌دریغی داشتند.

حروفچینی و صفحه‌آرایی را سرکار خانم عباسپور انجام دادند.

فعالیتهای مربوط به چاپ و انتشار توسط آقای سالارنیا و تهیه عکس و اسلاید توسط آقای قائدی انجام شد.

همکاران ارجمند بخش ژنتیک و فیزیولوژی آقای ناصری و خانمها: بهرامی، قدردان و جمالپور در فعالیتهای اجرایی و سازگاری گیاه صمیمانه همکاری داشتند.

لازم است از کلیه همکاران نامبرده تشکر و قدردانی نموده و از عزیزانی که به هر نحو در انجام این بررسی همکاری داشت و نامشان ذکر نشد پوزش بطلبم.

منابع

۱- اسکندری، شاهرخ و عبدالرضا اکبرین ۱۳۷۳. صنایع جانبی زیتون - روغنکشی. برگزیده مقالات اولین گردهمایی بررسی مسائل زیتون، سازمان کشاورزی گرگان و گنبد. صفحات ۲۹۵-۲۸۷.

۲- اشراقی، منصور ۱۳۷۳. ضرورت توجه به نظام بهره‌برداری از باغات زیتون. برگزیده مقالات اولین گردهمایی سراسری بررسی مسائل زیتون، سازمان کشاورزی گرگان و گنبد، صفحات ۷۲-۶۷.

۳- اعطاء، ماشاءالله، محمود طاووسی و عبدالواحد حاتمی ۱۳۷۳. بررسی و مقایسه عملکرد میوه و روغن ارقام مختلف زیتون در خوزستان. نشریه نهال و بذر جلد ۱۰ شماره‌های ۳ و ۴.

۴- حسن عباسی، نوروز علی ۱۳۷۳. زیتون درختی مقدس و اعجاب‌انگیز با کاربردهای مختلف. برگزیده مقالات اولین گردهمایی سراسری بررسی مسائل زیتون، صفحات ۴۸-۳۳.

۵- حقیقی، مهدی ۱۳۷۳. بازاریابی و تبلیغات زیتون. برگزیده مقالات اولین گردهمایی سراسری بررسی مسائل زیتون، صفحات ۲۸۶-۲۷۹.

۶- خوشکام، صغری و اشرف نانکلی ۱۳۷۳. تولید گیاهچه‌های زیتون به روش کشت بافت. برگزیده مقالات اولین گردهمایی سراسری بررسی مسائل زیتون، سازمان کشاورزی گرگان و گنبد ۲۲۴-۲۲۱.

۷- سعادت لاجوردی، ناصر ۱۳۵۹. دانه‌های روغنی انتشارات دانشگاه تهران صفحات ۱۸۸-۱۸۰.

۸- سلطانی، علی ۱۳۷۵. بررسی دو روش تولید نهال زیتون *(Olea europaea)* از طریق بذر (جنسی) و کشت بافت (غیرجنسی). پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۹- طباطبایی، محمد ۱۳۷۴. زیتون و روغن آن، صندوق مطالعات توسعه کشت زیتون. ۴۰۰ صفحه.

۱۰- طباطبایی، محمد ۱۳۷۳. بوم‌شناسی زیتون. برگزیده مقالات اولین گردهمایی

سراسری بررسی مسائل زیتون، سازمان کشاورزی گرگان و گنبد، صفحات ۲۸-۵.
۱۱- علاءالدینی، حسینعلی ۱۳۷۶. زیتون، نشریه نهال و بذر شماره ۸۶ صفحات ۲۵-۲۳.
۱۲- همتی، خدایار ۱۳۷۳. مبدأ و شرایط اکولوژیکی زیتون، برگزیده مقالات اولین گردهمایی سراسری مسائل زیتون، سازمان کشاورزی گرگان و گنبد، صفحات ۱۲۵-۱۲۱.
۱۳- هنرنژاد، رحیم ۱۳۷۲. اهمیت و کاربرد کشت سلول و بافتهای گیاهی در اصلاح نبات، اولین کنگره زراعت و اصلاح نبات، کرج، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. صفحات ۳۲۹-۳۱۵ خلاصه مقالات.
14- Boa, Z. H., Y. F., Ma, K.J., Wang, W.Q., Yong, and P.F., Zhng 1980. Introduction of Plants from the hypocotyl of *Olea europaea* L. *in vitro*. Acta. Bot. Sin.: 2.
15- Bajaj, Y. P.S. 1992 Biotechnology in Agriculture and Forestry V. 18. High-Tech and Micropropagation. II Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 493-506.
16- Bajaj, Y.P.S. 1989 Biotechnology in Agriculture and Forestry V. 1 Tree, Springer-Verlug Berlin Heidelberg, pp 253-267.
17- Brousse, G. 1989 Olive in: Robbelen, G., R.K., Downey, and A. Ashri, Oil Crops of the World. McGraw-Hill, Inc. pp. 462-474.
18- Canase, L.A. and A.Benbadis 1988 *In vitro* plant Regeneration from cotyledon fragments of the Olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Science, 56-74, Elsevier Scientific Publishers Ireland Itd.
19- Grossoni, P. 1979. Problems concerning the in vitro culture of olive (*Olea europaea*). Giornald-Botanico-Italiano: 113.
20- Hartmann Hudson, T., M. Kofranek Anton 1988. Plant Science, Growth, Development and Utilisation of Cultivated Plants. 2 edidion by Prentice-Hall, Inc. pp 614-615.
21- Lavee, S. 1977. The growth potential of olive fruit mesocarp *in*

vitro tissue culture for horticultural porposes, Acta Hortic, 78: 128-133.

22- Lavee, S. and N. Adiri 1974. The effect of abscisic acid and gibberellic acid on development of apple and olive callus. In plant growth substances, VI Tiss. Cul. Pro. 8th Int. Conf. Hirokawa Tokyo.

23- Lavee. S. and G. Messer 1969. The effect of growth regulating substanses sand light on olive callus growth *in vitro*. J. Exp. Bot, 20: 218-221.

24- Luis, A., L.C., Canas, and Miguel Vicente 1987. Vegetative propagation of the olive tree from *in vitro* cultured embryos. Plant Science, 50: 85-90.

25- Massimo, M. and E. Rugini 1993. *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues, Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 283-288.

26- Mitrokos, K., A. Alexaki, and P. Papadimitriou 1992. Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. J. Plant Physiol, 139.

27- Rinos, Th. and K. Mitrakos 1991. Rhizogenesis and somatic emberyogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* var. silvestris) mature zygotic embryos. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 27: 82-89.

28- Ozkaya, M. 1992 Propagation of olive (*Olea europaea*) by tissue culture, Chania (Greece): 80.

29- Rama, P. and C. A. Pontikis 1990. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea salvia* L.) Kalamon. Journal of Horticultural Science, 65: 3.

30- Rugini, E., A. Jacoboni, and M. Luppino 1993. Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on in vitro rotting and on endogenous polyamine changes in difficult to root woody species. Scientia Horticulture, 53: 63-72.