کشت تک گره جایگزین کشت بذر

تکثیر و ازدیاد فلفل در ایران معمولاً از طریق کاشت بذرهاي وارداتي از دیگر کشورها صورت مي‌گیرد که این بذرها، با قیمت بالا وارد شده، ضمن تحمیل هزینه بر اقتصاد، کشور را با مشکلات و محدودیت‌هاي وارداتي نیز مواجه مي‌کند. به همین جهت، استفاده از تکنیك‌هاي مختلف کشت بافت در جهت تکثیر فلفل و تولید گیاهاني با کیفیت بالا و عاري ازعوامل بیماري‌زا مي‌تواند گامي مهم در جهت رفع مشکلات موجود در مسیر تولید و تکثیر آن، کاهش هزینه‌هاي اولیه کشت و کار این گیاه، ترغیب تولیدکنندگان به سرمایه‌گذاري در این زمینه و در نهایت، ایجاد زمینه مناسب اشتغال کشاورزي گردد (اطرشی، ۱۳۸۹).

تاکنون پژوهشگران مختلفي در سطح دنیا تلاش کرده‌اند تا از طریق تکنیك‌هاي مختلف کشت بافت، روش مناسب و مقرون به صرفه‌اي براي ازدیاد فلفل دلمه‌اي پیدا کنند (Phillips, 1996; Hussain et al., 1999). استفاده از تکنیك کشت بافت از قسمت‌هاي مختلف گیاه، از جمله: جوانه‌هاي انتهایي، جوانه‌هاي جانبي، ساقه، هیپوکوتیل و کوتیلدون گزارش شده است ولي اکثرروش‌هاي ریزازدیادي فلفل (*C. baccatum, C. frutescens and C.*) وابسته به رقم بوده و در مورد برخی از ارقام دیگر کارایي چنداني نداشته است (Agrawal, al et 1989).

آماده سازي و کشت بذرها

در ابتدا به منظور ضدعفوني نمودن سطحي، بذور به مدت ۶۰ ثانیه در الکل (۹۶ %) غوطه‌ور گردیده، پس از سه بار شستشو با آب مقطراستریل، به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۲۰ %) به همراه یك قطره توبین ۲۰ % قرار گرفتند. در مرحله بعد بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. براي جوانه‌زني، بذرها در یك ارلن حاوي۵۰ میلي‌لیترمحیط پایه استریل کشت داده شده، در اتاق رشد تحت فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکي با شدت نور ۲۴۰۰ لوکس و دماي 24C° به مدت ۵ هفته نگهداري شدند.

کشت تك گره

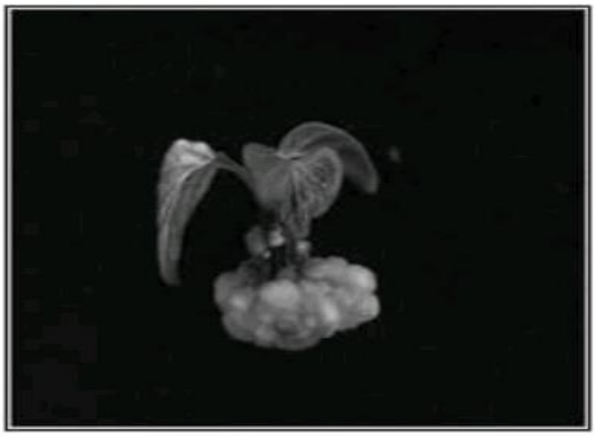
ظروف حاوي گیاهچه‌هاي ۵-۴ هفته‌اي (با اندازه تقریبي ۱/۵ -۱ سانتي‌متر) حاصل از کشت بذرها در شرایط استریل از ارلن خارج و ساقه آنها به شیوهاي برش داده شود که هر ریزنمونه حاصل داراي یک گره باشد. سپس هر ۵ ریزنمونه به صورت عمودي در ظروف کشت حاوي ۵۰ میلي‌لیتراز محیط پایه MS حاوي غلظت‌هاي متفاوت از تنظیم کننده‌هاي مختلف رشد گیاهي واکشت شدند.

محیط کشت باید داراي سه درصد ساکارز، ۶ گرم در لیتر آگار و۴/ % زغال فعال باشد. pH محیط در ۵/۸ تنظیم شده، عمل سترون‌سازي آنها در اتوکلاو با فشار دو یک اتمسفر و دماي 121 C° براي مدت ۲۰ دقیقه انجام گردد. ریزنمونه‌هاي کشت شده در اتاق رشد با شرایط ذکر شده در بالا و به مدت ۴ هفته نگهداري شدند. پس از آن که گیاهچه‌ها به حد مطلوب رشد خود رسیدند، براي انجام دور بعدي کشت تك‌گره استفاده شدند و یا مقاوم‌سازي شده و به گلخانه انتقال داده شدند (شکل ۱).

سازگارسازي و انتقال به گلخانه

قبل از کشت گیاهچه‌هاي حاصل در شرایط گلخانه، عمل سازگاری آنها در فیتوترون صورت گرفت. براي این کار، گیاهچه‌ها در شرایط in vitro به گلدان‌هاي حاوي ترکیب پیت ماس و کوکوپیت با نسبت ۳/۱ منتقل شده و در فیتوترون تحت شرایط رطوبت نسبي ۷۵ درصد، دماي 25 C° و شرایط نوري ۳۰۰۰ لوکس براي مدت ۲۰ روز نگه‌داري شدند. در مرحله بعد، گیاهچه‌هاي سازگار شده به گلخانه منتقل گردیده، تحت شرایط درجه حرارت شب ۱۲ درجه سانتي گراد، طول روز ۱۶ ساعت و طول شب ۸ ساعت قرار گرفتند.

این پروتکل قابل بهینه سازی برای انواع گیاهان از جمله سبزیجات می‌باشد.کاربرد این روش در مواقعی که از لحاظ اقتصادی قابل توجیه باشد بسیار سودمند می‌باشد.در ادامه مواردی از کاربرد آن در دیگر گیاهان را بررسی می‌کنیم.



شكل ۱ -رشد مناسب ريزنمونه‌ي فلفل حاصل از كشت تك گره در محيط باززايي حاوي زغال فعال با تركيب هورموني BAP، ۳۰ روز پس از كشت

ريزنمونه‌هاي باززايي شده پس از ريشه‌زايي در محيط حاوي IBA ،جهت مقاوم‌سازي به فيتوترون و سپس به محيط گلخانه منتقل شدند. حدود ۹۰-۷۰ % از گياهچه‌هاي حاصل از كشت بافت در گلخانه ماندگاري خوبي نشان داده و رشد مطلوبي داشتند. گياهان رشد يافته پس از طي مراحل رويشي گل داده و ميوه نيزتوليد نمودند. در مجموع، روش به‌كار گرفته شده در اين تحقيق كه از طريق كشت ساقه داراي تك‌گره از گياهان حاصل از بذر يا حاصل از تك‌گره‌هاي با واكشت متوالي صورت گرفت، روش مناسبي جهت ريزازديادي و كشت انبوه اين رقم است (اطرشی، ۱۳۸۹).

كشت تک گره در گوجه فرنگی

گیاه گوجه فرنگی با نام علمی .Lycopersicon esculentum Miller گیاهی علفی یک ساله متعلق به خانواده سیب زمینی می باشد که با میانگین تولید بیش از ۶/۸ میلیون تن در سال ۲۰۱۱ به عنوان یک گیاه مهم از نظر اقتصادی و بعد از گندم، دومین محصول کشاورزی ایران می باشد. این گیاه به صورت بسیار گسترده به عنوان سبزی تازه یا چاشنی و در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و صنعتی بکار می رود. رقم های مختلف گوجه فرنگی به دلیل ویژگی های منحصر به فرد این گونه برای سایر فعالیت های دست ورزی ژنتیکی از جمله تولید واکسن خوراکی می باشد. علاوه بر این، از آنجا که روش تکثیر این گیاه از طریق بذر بوده و تکثیر گوجه‌فرنگی در ایران از طریق کاشت بذور وارداتی با قیمت بالا و محدودیت های متفاوت، صورت می‌گیرد؛ ضرورت استفاده از تکنیک کشت بافت به عنوان روشی سریع و زود بازده و غیر وابسته به ژنوتیپ، به منظور تولید و تکثیر این گیاه افزایش می یابد. در باززایی مستقیم ترکیبات هورمونی بدست آمده از سه نوع سایتوکینینBAP ، Kinو Zea در ترکیب با دو نوع اکسین NAA و IAA و ریزنمونه های هیپوکوتیل، کوتیلدون و برگ استفاده شد. در مرحله ساقه دار کردن جوانه ها، ریزنمونه ها درون شیشه مربایی حاوی ۳۰ میلی گرم محیط واکشت شدند. در خصوص بررسی تأثیر تیمارهای هورمونی بر ریشه زایی، ساقه های حاصل از باززایی، ساقه های بدون ریشه به محیطهای حاوی تیمارهای ریشه‌زایی حاوی غلظت‌های مختلف IAA و IBA انتقال پیدا کردند. نتایج نشان داد که سایتوکینین Kin و اکسین NAA هیچ‌گونه اثر مثبتی بر القای باززایی ندارند، در حالی که ترکیب سایتوکینین BAP با اکسین IAA تأثیر چشمگیری بر القای باززایی و مرحله طویل‌سازی ساقه‌ها دارند. سایتوکینین Zea نیز تأثیر مثبتی بر باززایی گذاشته است. از میان سه ریزنمونه، برگ بهترین ریزنمونه جهت القای باززایی می باشد. ساقه‌ها به همه‌ی تیمارهای ریشه زایی پاسخ مثبت دادند. گیاهچه های حاصل با موفقیت با شرایط محیطی سازگار شده و به گلخانه منتقل گردیدند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همسو با نتایج دیگر محققان، برای تکثیر بهینه گیاه گوجه‌فرنگی، باززایی مستقیم متدی کارآمد و با سرعت عمل بالاتر و درجه اطمینان بالا می‌باشد (اطرشی، ۱۳۹۴).

کشت تک گره در گیاه گل مغربی

تعداد کم بذر، ریز بودن بذر، قوه نامیه پایین، خواب بالای بذور و پایین بودن درصد جوانه‌زنی بذور، از مشکلات اصلی تکثیر گل مغربی می‌باشد. لذا این پژوهش با هدف بررسی ریزازدیادی با استفاده از ریزنمونه قلمه گره و تغییر نوع و میزان هورمون گیاهی انجام شد .نتایج حاکی از آن است که گل مغربی صورتی دارای هورمونهای داخلی فراوان بوده و نیاز به غلظتهای کمی از هورمون به خصوص هورمونهای گروه سایتوکنین جهت ریزازدیادی دارد (صادقی، ۱۳۹۴).

نتیجه‌گیری

در ارقام و گونه‌های گیاهی که در آنها تکثیر از طریق بذر دشوار است، می توان از روش‌های محتلف کشت بافت برای ریزازدیادی آنها استفاده کرد. **همچنین از این طریق می‌توان برای ثابت نگه‌داشتن هتروزیگوتی در واریته‌های هیبرید استفاده کرد**. با استفاده از روش کشت تک گره در صورت پاسخ دهی در گیاه مربوطه و مناسب بودن محیط کشت میتوان مشکل تفرق صفات که در نسل F1 به بعد، در ارقام هیبرید مواجه آن هستیم را رفع کنیم. استفاده از این روش به علت تولید گیاهچه‌های سالم و عاری از ویروس و کاهش تفرق در تعدادی از گیاهان زراعی اجرا شده است. مشکل عمده در این روش وجود هزینه‌های اولیه برای ساخت محیط و تجهیزات لازم می‌باشد.

منابع:

۱- اطرشی، م. نورمحمدی، ن. مرادی، ک. ۱۳۹۴. تهیه‌ی پروتکل تولید انبوه گوجه فرنگی با استفاده از تکنیک کشت تک گره. کرج: پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران. شماره ثبت ۴۳۱۹۷

۲- اطرشي، م. مرادی، ک. خیام نکوئی، م. ۱۳۸۹. ريزازديادي گياه فلفل دلمه‌اي در شرايط كشت درون شيشه‌اي . پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي منطقه مركزي كشور ABRII))،اصفهان، ایران

۳- صادقی، ن. مرتضایی نژاد، ف. ۱۳۹۴. ریزازدیادی گیاه گل مغربی با استفاده از قلمه‌ی تک گره. کنفرانس بین المللی پژوهش های نوین در علوم کشاورزی و محیط زیست، ص ۱۰.

4- Agrawal, S., Chandra, N. and Kothari, S. L. (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (Capsicum annuum L. cv. Mathania). Plant Cell Tissue Organ Culture 16: 47-55.
5- Phillips, G. C. Hubstenberger, J. F. 1985 Organogenesis in pepper tissue cultures. Plant Cell Tissue Organ Culture 4: 261-269.
6- Hussain, S., Jain, A. Kothari, S. L. 1999 Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in Capsicum annum L. Plant Cell Reports 19: 64- 68.