

بهینه‌سازی تولید و باززایی کالوس در گیاه کیوی فروت به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی با اهداف دارویی، غذایی و تجاری

زهرا ممتاز ویشکائی^{۱*}، حبیب الله سمیع زاده لاهیجی^۲، محمود قاسم نژاد^۳، محمد محسن زاده گلفرانی^۴، شاپور عبدالهی^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان

۲- استاد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان

۳- استاد باغبانی دانشگاه گیلان

۴- استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گیلان

۵- مربی اصلاح نباتات پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال کشور

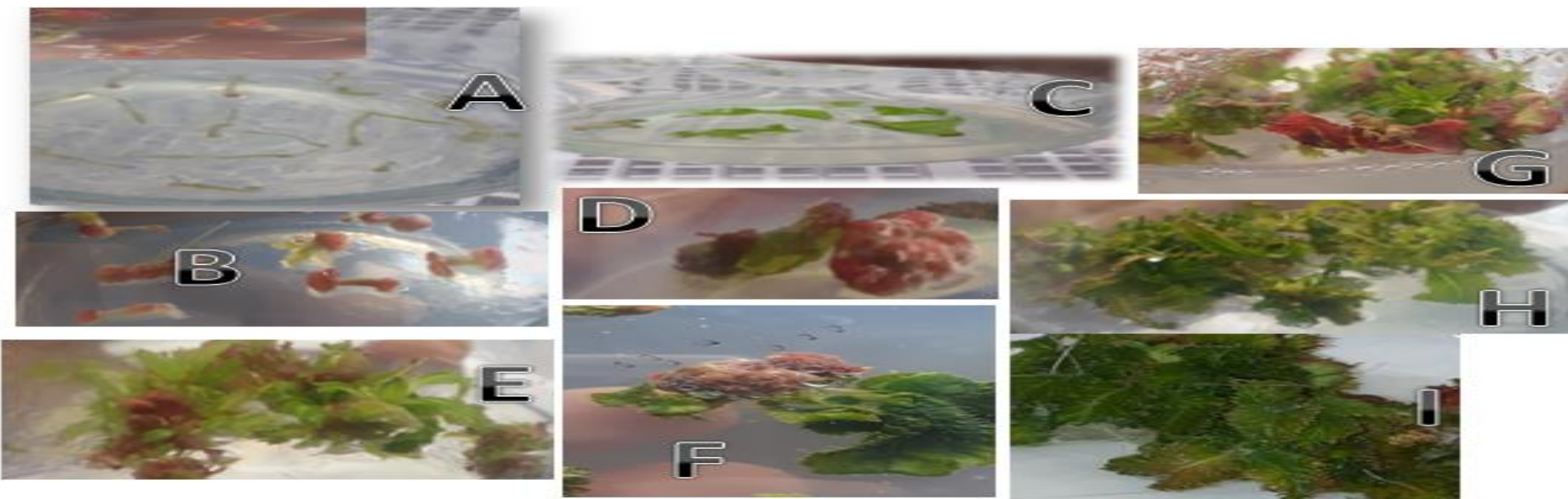
Zahramomtaz.13741374@gmail.com-*

نتایج و تحلیل

جدول ۲. آنالیز واریانس برای صفات کالوس‌زایی و باززایی گیاه کیوی فروت *Actinidia chinensis*.

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد کالوس					میانگین مربعات				
		تعداد کالوس دمبرگ	تعداد کالوس حاشیه برگ	تعداد کالوس جوانه بذر	درصد کالوس زایی دمبرگ	درصد کالوس زایی حاشیه برگ	درصد کالوس زایی جوانه بذر	درصد کالوس زایی دمبرگ	درصد کالوس زایی حاشیه برگ	درصد کالوس زایی جوانه بذر	
تیمار	۲	۵/۵۲**	۰/۰۸۱ ns	۰/۷ ns	۲۲۵/۲۷ ns	۹۷/۵۹ ns	۰/۱۳**	۴۷/۲۵**	۰/۱۱ ns	۰/۱۱ ns	
خطا	۵	۰/۱۳۶	۰/۰۳۶	۱/۱۶	۴۶/۴۸	۶۴/۲۹	۰/۰۰۸	۲/۶۳	۱/۳۳	۱/۳۳	
ضریب تغییرات		۲۱/۶۶	۰/۱۲۹	۳۳/۴	۲۸/۳۴	۱۴/۹۴	۱۲/۲۵	۸/۸۶	۱۰/۸۵	۱۰/۸۵	
منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالوس					میانگین مربعات				
		درصد کالوس زایی دمبرگ	درصد کالوس زایی حاشیه برگ	درصد کالوس زایی جوانه بذر	درصد کالوس زایی دمبرگ	درصد کالوس زایی حاشیه برگ	درصد کالوس زایی جوانه بذر	درصد کالوس زایی دمبرگ	درصد کالوس زایی حاشیه برگ	درصد کالوس زایی جوانه بذر	
تیمار	۲	۲/۱۱ ns	۰/۰۲۳ ns	۲۰۸/۲۳ ns	۲۷۷/۷ ns	۲۴/۱۶**	۱۲۴ ns	۴۵/۴ ns	۰/۱۱	۰/۱۱	
خطا	۶	۰/۱۷۷	۰/۱۵۲	۱۳۸/۸	۳۴۷/۲	۱/۴۳	۰	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	
ضریب تغییرات		۵/۸	۲۹/۰۹	۱۲/۸۵	۲۰/۹	۰/۰۳۹	۰	۱/۰۷	۱/۰۷	۱/۰۷	

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد. ns عدم معنی‌داری.



شکل ۱. مراحل تولید کالوس و باززایی گیاه کیوی فروت. A: کشت ریزنمونه جوانه بذر و آغازش کالوس B: کشت ریزنمونه دمبرگ و آغازش کالوس C: کشت ریزنمونه حاشیه برگ D: تولید کالوس از حاشیه برگ E: باززایی از کالوس‌های دمبرگ F: بالغ تر شدن برگ‌های حاصل از باززایی دمبرگ G: باززایی حاصل از کالوس‌های حاشیه برگ H: باززایی حاصل از کالوس‌های جوانه بذر I: شاخساره آماده برای جداسازی و مرحله ریشه زایی.

رنگ و بافت کالوس‌های حاصل از ریزنمونه‌های جوانه بذر، دمبرگ و حاشیه برگ بسته به غلظت تنظیم کننده رشد مورد استفاده متفاوت است. سرعت، تعداد کالوس‌زایی و زمان باززایی جوانه بذر و دمبرگ بیشتر از حاشیه برگ می‌باشد. کمترین زمان آغازش کالوس ۹ روز و بیشترین زمان ۲۸ روز پس از کشت ریزنمونه‌ها بوده است. کمترین زمان باززایی در ریزنمونه‌ها ۲۴ روز و بیشترین زمان ۳۶ روز پس از کشت بوده است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل بیانگر این مطلب است که محیط کشت $\frac{1}{2}$ MT+ 0.9 Zea+ 13.31 BA +50.8 IBA بهترین محیط کشت جهت القای کالوس بوده و همچنین مناسب برای باززایی کالوس‌ها می‌باشد. بطور کلی بهترین ریزنمونه‌ها که بیشترین عملکرد را در تولید کالوس‌ها داشته، دمبرگ و جوانه بذر بوده است. همچنین در محیط کشت بهینه شده، ریزنمونه دمبرگ هم دارای عملکرد قابل قبولی بوده و کالوس و گیاهچه‌های تولیدی آن مطلوب می‌باشد. بنابراین این روش بسیار مناسب جهت تولید نهال‌های کیوی می‌باشد. کیوی از نظر صادرات و اقتصاد، تولید انواع داروها و مکمل‌های ویتامینه، تغذیه و صنعت از اهمیت فراوانی برخوردار است. تولید انواع اسانس و آنزیم‌ها از جمله این تولیدات می‌باشد. سالیانه ارزش زیادی از صادرات کیوی وارد کشور می‌شود که رونق اقتصادی به همراه دارد.

منابع

جلیلی مزندی، ر. (۱۳۸۹). میوه‌های ریز (انگور، توت‌فرنگی، کیوی، فروت، تمشک، انگورفرنگی حبه درشت، انگورفرنگی حبه ریز و ذغال اخته). انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. چاپ دوم. صفحه ۲۹۷.

مفتی، ج. (۱۳۸۸). کیوی. انتشارات سروش هدایت. چاپ اول. صفحه ۷۹.

Abbasi, B., Saxena, P.K., Murch, S.J., Liu, C.Z. (2007). Echinacea biotechnology: Challenges and opportunities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), 481-492.

Bhaskaran, S., & Smith, R. H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*, 30(6), 1328-1337.

Garcia, R., Pacheco, G., Falcao, E., Borges, G., & Mansur, E. (2011). Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callus induction and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(1), 47-54.

Han, Y., Jin, X. L., Wu, F. B., & Zhang, G. P. (2011). Genotypic differences in callus induction and plant regeneration from mature embryos of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 12(5), 399-407.

Hohtola, A. (1988). Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature Scots pine. *Plant cell, tissue and organ culture*, 15(3), 211-222.

JayaSree, T., Pavan, U., Ramesh, M., Rao, A. V., Reddy, K. J. M., & Sadanandam, A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. *Plant cell, tissue and organ culture*, 64(1), 13-17.

Khawar, K. M., Sarhin, E. O., Sevimay, C. S., Cocu, S. A. T. I., Parmaksiz, I., Urganbey, S., ... & Ozcan, S. (2005). Adventitious shoot regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L.

Mami, G., Kundra, A., & Haque, A. (2018). Kiwi value chain in Arunachal Pradesh: issues and prospects. *Agricultural Economics Research Review*, 31(1), 123-130.

Mandal, A. K. A., & Gupta, S. D. (2001). Direct shoot organogenesis and plant regeneration in safflower. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(1), 50-54.

Neibaur, I., Gallo, M., & Altpeter, F. (2008). The effect of auxin type and cytokinin concentration on callus induction and plant regeneration frequency from immature inflorescence segments of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44(6), 480-486.

Shinoyama, H., Nomura, Y., Tsuchiya, T., & KAZUMA, T. (2004). A simple and efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *chrysanthemum* [Dendranthem × grandiflorum (Ramat.) Kitamura]. *Plant Biotechnology*, 21(1), 25-33.

Sherpa, S. (2013). Natural resource management approaches and technologies in Nepal: Technology - Kiwifruit cultivation. <http://lib.icimod.org/record/28277/files/Technology.pdf>.

Tomas-barbaran, F. A., & Robins, R. J. (1997). *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Oxford science publications. Oxford UK. 375.

Tyagi, S., Nánher, A. H., Sahay, S., Kumar, V., Bhamini, K., Nishad, S. K., & Ahmad, M. (2015). Kiwifruit: Health benefits and medicinal importance. *Rashtriya krishi*, 10(2), 98-100.

چکیده

کشت درون شیشه‌ای کیوی با توجه به اهمیت این محصول در تغذیه، تولید داروهای ویتامینه و افزایش مصرف سرانه آن در دنیا، مورد توجه است. به کمک روش‌های نوین زیست فناوری تولید گیاهان در کوتاه‌ترین زمان ممکن امکان‌پذیر است. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی و تولید کالوس و باززایی میوه کیوی فروت با استفاده از ریزنمونه‌های حاشیه برگ، دمبرگ و جوانه بذر مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور ریزنمونه‌های گیاه در محیط کشت MT حاوی غلظت‌های مختلف از تنظیم کننده‌های رشد زاتین کشت گردیدند. باززایی گیاه نیز در محیط کشت‌های مختلف بررسی شد. در این تحقیق، بررسی‌ها نشان داد که بهترین ریزنمونه در القای تولید کالوس، ریزنمونه‌های دمبرگ و جوانه بذر بوده و مناسب‌ترین محیط کشت $\frac{1}{2}$ MT+ 0.9 Zea+ 13.31 IBA +50.8 BA می‌باشد. ریزنمونه‌ها در این محیط کشت در مدت زمان کوتاهی پس از تولید کالوس‌ها به سمت باززایی می‌روند. محیط کشت‌های حاوی ترکیب تنظیم کننده‌های رشد؛ زاتین، بنزیل آدنین و ایندول بوتریک اسید، باعث افزایش قابل توجهی در میزان تولید کالوس گردید. بنابراین میزان تولید کالوس و باززایی به میزان تنظیم کننده‌های رشد خارجی وابسته است و میزان تنظیم کننده‌های خارجی به شدت به ژنوتیپ و تنظیم کننده‌های رشد داخلی گیاه بستگی دارد.

مقدمه

امروزه در شمال کشورمان گیاه کیوی فروت در سطح وسیع پرورش داده می‌شود و ایران نیز از کشورهای صادرکننده کیوی فروت به‌شمار می‌آید. کیوی فروت درون سرخ (*Actinidia chinensis*) محبوبیت خاصی بین ارقام کیوی داشته، به علاوه تولید آن در سطح انبوه می‌تواند بازار فروش مطلوبی در ایران و بازارهای جهانی داشته باشد. کیوی درختی دو پایه است که ازدیاد این گیاه از طریق بذر، پیوند زدن و تهیه قلمه امکان‌پذیر می‌باشد. ازدیاد از طریق بذر روش معمول نبوده زیرا گیاه حاصل شده از بذر به دلیل تفرق صفات شبیه پایه مادر نمی‌باشد. روش معمول ازدیاد کیوی فروت از طریق پیوند قلمه می‌باشد ولی استفاده از روش‌های ریزازدیادی (کشت بافت) محدودیت‌های فصلی را برطرف می‌کند. در روش کشت بافت تعداد زیادی از گیاهان در مدت زمان کوتاهی تولید می‌شوند که از لحاظ ژنتیکی شبیه گیاه مادری خواهند شد. در این روش گیاهچه‌های کیوی با استفاده از تکنیک آزمایشگاهی و ریزنمونه‌های فعال و در حال رشد احیا می‌شوند. بدست آوردن محیط کشت مناسب برای رشد و باززایی ریزنمونه‌های گیاه کیوی فروت بسیار مهم و حساس می‌باشد. کیوی فروت منبع غنی از ویتامین C می‌باشد. این میوه حاوی ویتامین‌های A و E نیز می‌باشد. پوست آن منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌های فلاونوئید است. مطالعات انجام شده حاکی از آن است که مصرف روزانه کیوی فروت بر بیماری‌هایی مانند آسم، دیابت و اختلالات خواب، پیشرفت‌های مثبتی را نشان داده‌اند. از خواص دارویی میوه کیوی فروت می‌توان به پیشگیری از سرطان‌های مختلف، پایین آوردن کلسترول خون، پیشگیری از یبوست‌های طولانی و ... اشاره کرد. به دلیل اهمیت‌های تجاری و تغذیه‌ای گیاه کیوی فروت این تحقیق با هدف بهینه‌سازی شرایط تولید کالوس و باززایی، به منظور استفاده در مهندسی ژنتیک برای ریزازدیادی و تولید ارقامی با ویژگی‌های تجاری بهتر انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

جهت تامین منبع ریزنمونه‌ها از گیاهچه‌های کیوی فروت رشد یافته در شرایط یکسان و محیط کشت عاری از آلودگی و دارای مواد یکسان در محیط درون شیشه‌ای استفاده شد. ریزنمونه‌های دمبرگ، حاشیه برگ و جوانه بذر در محیط کشت‌های مختلف جدول ۱ جهت تولید کالوس استفاده گردید. تمامی آزمایشات در ۳ تکرار در هر تیمار انجام گرفت. در هر تکرار ۶ ریزنمونه کشت گردید و در اتاق رشد با فتوپریود مناسب نگهداری شدند. سپس تغییرات ثبت شده مورد بررسی کمی و کیفی قرار گرفتند. طرح آماری مورد استفاده طرح کاملاً تصادفی بوده و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام گردید.

جدول ۱: ترکیبات محیط کشت مورد استفاده جهت القا و تولید کالوس از گیاه *Actinidia chinensis*

محیط کشت	ترکیبات تیماری (میکرو مول بر لیتر)	ایندول بوتریک اسید (IBA) (میکرو مول بر لیتر)	زاتین (Zea) (میکرو مول بر لیتر)	بنزیل آدنین (BA) (میکرو مول بر لیتر)
$\frac{1}{2}$ MT	0.9zea+ 50.8 IBA+13.31 BA	۵۰/۸	۰/۹	۱۳/۳۱
$\frac{1}{2}$ MT	1.82 zea+ 50.8 IBA+13.31 BA	۵۰/۸	۱/۸۲	۱۳/۳۱
$\frac{1}{2}$ MT	2.73 zea+ 50.8 IBA+13.31 BA	۵۰/۸	۲/۷۳	۱۳/۳۱
$\frac{1}{2}$ MT	0 zea+ 0 IBA+0 BA	.	.	.