بررسی اثر دو تنظیم کننده رشد بر روی شاخه‌زایی درون شیشه مرکبات *Citrus unshiu*

کاملیا لاکدشتی[1]، سید وحید علوی[2]، یاور شرفی[3] و عالم آرا غلامی[4]

1-دانشجوی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه ۲k.lakdashty@yahoo.com- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران،ساری ۳-گروه علوم باغبانی، دانشگاه شاهد4-گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحدساری

چکیده

نارنگی انشو(*Citrusunshiu*)از جمله گونه های مرکبات است که از نظر اقتصادی حایز اهمیت می باشد. این پژوهش با هدف بررسی تاثیر دو تنظیم کننده رشد اکسین و سیتوکنین بر روی اندام‌زایی این نارنگی در شرایط درون شیشه انجام شد بدین منظور، سرشاخه‌های نارنگی انشو موجود در باغات مهدشت ساری به عنوان ریزنمونه‌جمع‌آوری، به آزمایشگاه منتقلو پس از گندزدایی در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS)حاوی سه غلظت (۰/۵ و ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر) از گروه هورمون-های اکسین، ایندول بوتیریک اسید (IBA) و از گروه سیتوکنین، بنزیل امینو پورین (BAP) در ۱۶ تیمار و ۷ تکرار کشت گردید. پس از۳۰ تا ۴۵ روز برخی از نمونه ها ابتدا تولید کالوس کرد و سپس به جوانه‌زایی انجامید و سایر آنها به طور مستقیم تولید جوانه کردند. نتایج نشان داد که غلظت]IBA (0.5)BAP(2),[در جوانه زایی غیرمستقیم وغلظت [BAP(0.5),IBA(0)]یا[BAP(1),IBA(0)] برای جوانه‌زایی مستقیم بهترین تاثیر را داشتند.

مقدمه

مرکبات یکی از مهمترین محصولات کشاورزی درنواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری در جهان است که سطح زیر کشت آن در ایران پیوسته در حال گسترش می‌باشد. از آنجایی که بیشتر گونه‌های مرکبات به دلیل جنین‌زایی سوماتیکی، چند-جنینی هستند ریزازدیادی و باززایی آنها بسیار حایز اهمیت می‌باشد.ریزازدیادی از طریق کشت بافت از جمله روش‌های غیرجنسی مهم برای تکثیر سریع گیاهان بشمار می‌آید همچنین تکثیر مرکبات از طریق روش‌های مرسوم سنتی زمان‌بر بوده لذا در سال‌های اخیر روش‌های باززایی مرکبات به روش کشت بافت گسترش زیادی یافته است (Carimi,۲۰۰۵).

نارنگی انشو یکی از مهمترین گونه‌های اقتصادی مرکبات می‌باشد که با تحمل دمای ۱۳- درجه سانتی‌گراد از جمله گونه‌های مقاوم به سرما بشمار می‌رود(قزوینی و فتاحی‌مقدم، ۱۳۸۹). بنابراین با توجه به پر محصول بودن این گونهما در این پژوهش به بررسی تاثیر اکسین و سیتوکنین بر روی اندام‌زایی نارنگی انشو در شرایط درون شیشه برای دستیابی به بهترین غلظت ترکیب هورمونی پرداختیم.

مواد و روش‌ها

سرشاخه‌های ۲ – ۳ سانتیمتری حاوی گره جانبی از درختان ۳۰ ساله موجود در باغات مهدشت ساری واقع در استان مازندران جمع آوری شد و به آزمایشگاه کشت بافت اتحادیه باغداران استان مازندران منتقل گردید. پس از طی مراحل گندزدایی با الکل اتیلیک ۸۰٪به مدت ۳۰ ثانیه و سپس کلریدجیوه ۰/۱٪به مدت ۵ دقیقه و در نهایت ۱۰ دقیقه درون وایتکس ۲٪ ضدعفونی و سپس درون لوله‌های شیشه‌ای سرسمباده‌ای استریل حاوی محیط کشت پایهMS به تنهایی و MS واجد

غلظت‌های مختلف هورمونی اکسین و سیتوکنین انتقال یافت و سپس در اتاقک رشد با حرارت۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰-۷۵٪ نگهداری شد.

ریزنمونه‌های مذکور به صورت افقی درون لوله‌های آزمایش حاوی ۸ گرم در لیتر آگار و ۳ درصد ساکارز همراهبا غلظت‌هایمختلف (۰/۵ و ۱ و۲ میلی‌گرم در لیتر) از هورمون‌های IBA , BAPبه همراه یک شاهد فاقد هر گونه هورمون در محیط کشت پایه MS با ۷ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی درلوله‌های شیشه‌ای سر سمباده‌ای مناسب، کشت شد(جدول ۱-۱). در تمام موارد ظروف حاوی محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱/۰۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد گندزدایی شدند.واکشت ریزنمونه‌ها هر بیست روز صورت گرفت.

جدول ۱-۱ : تیمارهای هورمونی ترکیبی درمحیط کشت

تنظیم کننده‌های رشد(برحسب میلی‌گرم در لیتر)		
اکسین	سیتوکنین	تیمار
IBA	BAP	
۲	۲	۱
۱	۲	۲
۰/۵	۲	۳
۱	۱	۴
۲	۱	۵
۰/۵	۱	۶
۲	۰/۵	۷
۱	۰/۵	۸
۰/۵	۰/۵	۹
۰	۰/۵	۱۰
۰	۱	۱۱
۰	۲	۱۲
۰/۵	۰	۱۳
۱	۰	۱۴
۲	۰	۱۵
۰	۰	۱۶

در پایان چهار ماه بعد از کشت، تعدادی از نمونه‌ها ابتدا تولید کالوس کرد و سپس به جوانه‌زایی انجامید(شکل۱-۱) و برخی نمونه‌های دیگر به طور مستقیم تولید جوانه کردند(شکل ۱-۲)سپس ریزنمونه‌هابرای بررسی اثر هورمون‌ها برروی رشد جوانه‌ها مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند نرم افزار آماری مورد استفاده در این پژوهشMSTAT-Cبود. فاکتورهای بررسی شده در این زمینه شامل درصد اندمزایی مستقیم، درصد تولید جوانه غیرمستقیم بود.

شکل ۱-۱

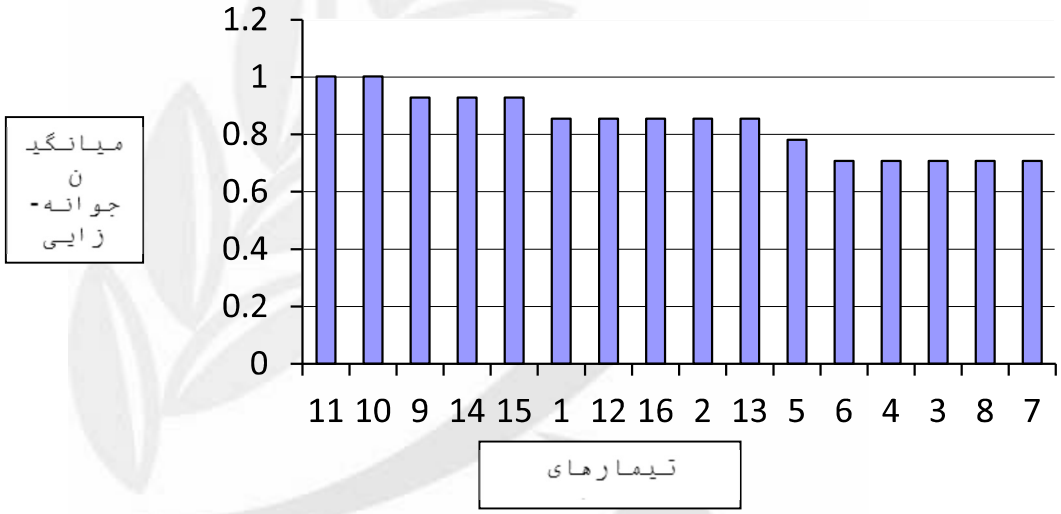
شکل ۱-۲

نتایج

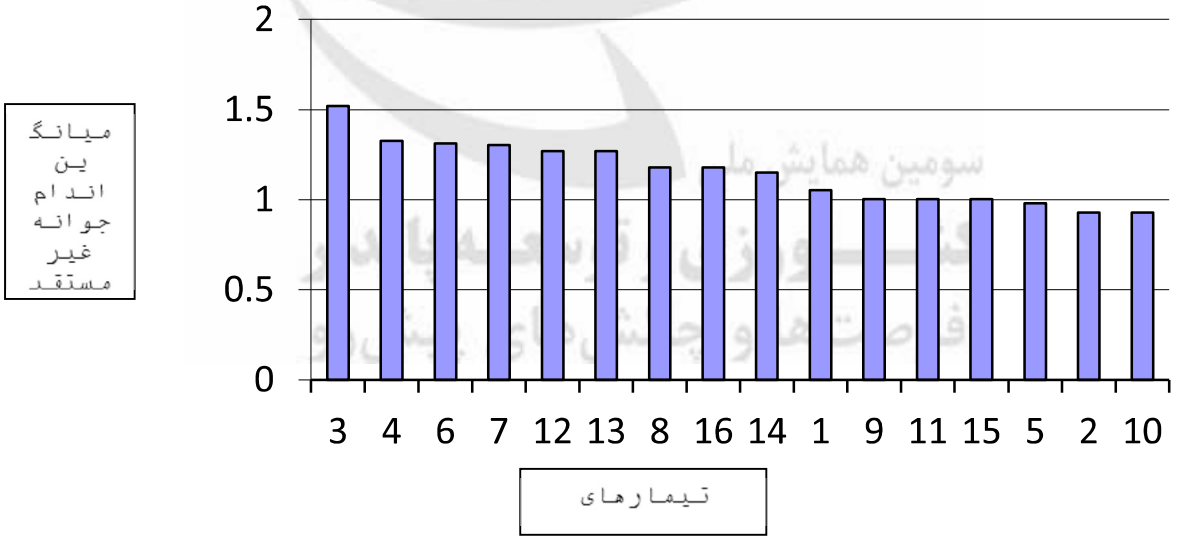
۳۰ تا ۴۵ روز پس از کشت، برخی نمونه‌ها بعد از ایجاد کالوس تولید جوانه کردند. درصدی از نمونه‌ها با توجه به غلظت هورمونی که در کشت آنها بکار رفته بود بدون القا کالوس به طور مستقیم ایجاد جوانه کردند بعد از گذشت ۴ ماه از رشد، نمونه‌ها از نظر صفت اندام‌زایی مستقیم و تولید جوانه غیرمستقیم، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

در خصوص صفتجوانه‌زایی مستقیم گرچه تجزیه واریانس اختلاف معنی داری بین تیمارها نشان نداد ولی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر از هورمونBAPدر ترکیب با غلظت‌های ۰ و ۰ میلی‌گرم در لیتراز هورمون IBAبالاترین میزان جوانه‌زایی مستقیم را داشته است(نمودار ۱-۱).برای صفت جوانه زایی غیرمستقیم ترکیب هورمون‌های BAPبه غلظت ۲ میلی‌گرم در لیترو IBA به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS بالاترین میزان تشکیل جوانه را داشته است(نمودار ۱-۲).

نمودار۱-۱: مقایسه میانگین‌های صفت جوانه‌زایی مستقیم در تیمارهای مختلف هورمونی روی محیط کشت MS



نمودار2-1: مقایسه میانگین‌های صفت اندام جوانه‌زایی غیرمستقیم در تیمارهای مختلف هورمونی روی محیط کشتMS



بحث

در این پژوهش به منظور ریزازدیادی سرشاخه‌های نارنگی انشو از غلظت‌های مختلف دو هورمون BAPوIBA استفاده شد .در رابطه با جوانه های تشکیل شده از کالوس یا جوانه‌زایی غیرمستقیم بهترین نتیجه حاصل از کشت در تیمار شماره ۳ یعنی ترکیب هورمون‌های BAPبه غلظت ۲ میلی‌گرم در لیترو IBA به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت پایه MS بود که بالاترین میزان تشکیل جوانه را داشته و برترین غلظت هورمونی برای جوانه‌زایی غیرمستقیم شناخته شد. بنابراینتایج ما نشان داد نسبت بالای BAP به IBA موجب شاخه‌زایی می‌شود. . در این خصوص Ibrahim (۲۰۱۲) با کشت قطعه کوتیلدونی پوملو (*C.grandis*) در محیط MS مکمل با ۱ و یا ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA شاخه‌زایی را از بافت کالوس ایجاد کردند و بهترین نتیجه را در ۱ میلی‌گرم در لیتر BA در مقایسه با ۲ میلی‌گرم در لیتر از این هورمون گزارش کردند. همچنین خلیل و همکاران (۲۰۱۱) از کشت تخمک *C.sinensis* در محیط MS که حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA بهینه غلظت برای شاخه‌زایی را گزارش کردند که این نیز با نتایج ما همسو بود.

منابع

۱) فتوحی‌قزوینی، ر.، و ج. فتاحی‌مقدم. ۱۳۸۹. پرورش مرکبات در ایران. انتشارات دانشگاه گیلان.

2) Carimi F 2005. Somatic Embryogenesis Protocol: *Citrus* . Jain Sm And Gupta Pk (Eds) Protocol For Somatic Embryogenesis In Woody Plants. Springer 321-343
3) Khalil, Sh. A., R. Zamir, N. Ahmad, M.Sajid, H.Fazal,M. Ali Khan,N. Seema, AndR.Alam. 2011.*In Vitro* Regeneration Of Plantlets From Unpollinated Ovary Culture In Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). African Journal of Biotechnology Vol. 10(67):15130-15134.

Ibrahim M. A.2012. *In Vitro* Plant Regeneration Of Local Pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck.) Via Direct And Indirect Organogenesis. Genetics And Plant Physiology, Vol 2 (3–4): 187–191.