برهمکنش 2,4-D، نوع محیط کشت و ریزنمونه‌های پایه لیسبون لمون (*Citrus limon* Burm. 'Lisbon') بر انگیزش پینه

حسین امین*[۱]، اختر شکافنده[۲]

[۱]استادیار بخش تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی داراب، دانشگاه شیراز، شیراز
[۲]دانشیار بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی شیراز، دانشگاه شیراز، شیراز
*نویسنده مسئول: hamin350@gmail.com

چکیده

پژوهش حاضر به صورت طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با چهار تکرار برای یافتن برهمکنش بهینه محیط کشت، ریز نمونه و تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D جهت القای تولید پینه در لیسبون لمون انجام شد. ریزنمونه‌ها شامل تخمدان تلقیح نشده، تخمک‌ها و آبدانک میوه‌های نابالغ بودند که پس از سترون‌سازی از میوه‌ها جدا شدند و روی محیط‌های کشت MS، MT و H+H همراه با ۵ غلظت 2,4-D (۰و ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند. مقایسه تاثیر برهمکنش ریزنمونه، 2,4-D و محیط‌های کشت نشان داد که در ریزنمونه‌های تخمدان و آبدانک بیشترین انگیزش پینه در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D روی محیط کشت MS وMT به دست آمد و در ریزنمونه تخمک بیشترین انگیزش، در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و مربوط به محیط کشت MT بود. کمیت و کیفیت پینه‌های تولیدی به سه عامل غلظت تنظیم کننده رشد 2,4-D، نوع ریزنمونه و ترکیب شیمیایی محیط کشت وابسته بود.

کلمات کلیدی: آبدانک، تنظیم کننده رشد، محیط کشت،

مقدمه

موفقیت تولید پینه باکیفیت در کشت بافت ریزنمونه‌های مرکبات به عوامل متعددی از جمله محیط کشت، غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، ژنتیک و نوع ریزنمونه‌ها وابسته است (امین، ۱۳۹۳). Sharma و همکاران، (۲۰۰۹) به منظور انگیزش پینه از ریز نمونه‌های نوک شاخه و گره‌های راف لمون وتروير سیترنج، از محیط کشت موراشیگی و اسکوگ همراه با ۰/۵ میلی گرم در لیتر کاینتین، ۲ میلی گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی گرم در لیتر NAA استفاده کردند. Kumar و Richa (۲۰۱۲)، تاثیر مقادیر مختلف 2,4-D، NAA و BAP را روی انگیزش پینه و باززایی گیاه در C. limonia، C. limon و C. pectinifera مورد بررسی قرار دادند. بیشترین میزان تشکیل پینه از قطعه‌های جوانه جانبی C. limonia و در تیمار ۳ میلی گرم در لیتر 2,4-D گزارش شد.

لیسبون لمون (Citrus limon Burm. 'Lisbon') در سال‌های ۴۳-۱۳۴۲ وارد ایران شد و به دلیل مقاومت بالای این رقم نسبت به تحمل شرایط نامساعد محیطی مانند گرما و بادهای تند و داغ (که در شرایط جنوب ایران متداول است) در سطح وسیعی در جنوب کشور از آن استفاده می شود (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۹). پژوهش‌های مختلفی در مورد القای تولید پینه در مرکبات انجام شده، اما گزارش‌ها در ارتباط با برهمکنش محیط کشت، نوع ریزنمونه و غلظت تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D بر پینه‌زایی در کشت بافت لیسبون لمون محدود است. به همین دلیل پژوهش حاضر برای یافتن تلفیق بهینه محیط کشت، ریز نمونه و تنظیم کننده رشد گیاهی 2,4-D جهت القای تولید پینه در لیسبون لمون انجام شد.

IrHC2019

مواد و روش‌ها

جمع آوری ریز نمونه‌های گیاهی

سری اول ریز نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش، تخمدان تلقیح نشده و سری دوم ریز نمونه‌ها شامل تخمک‌ها و آبدانک میوه‌های نابالغ لیسبون لمون بودند. جهت تهیه ریزنمونه‌های سری اول در اوایل فروردین، گل‌های بسته و برای تهیه ریزنمونه‌های سری دوم در اواسط اردیبهشت تا اواسط خردادماه، میوه‌های نابالغ، جمع آوری و به آزمایشگاه کشت بافت منتقل شدند.

سترون کردن ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌های سری اول پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا با آب معمولی و سپس در زیر دستگاه جریان هوا با اتانول ۷۰٪ به مدت ۵ دقیقه و کلراکس ۱ ٪ (حاوی۵/۲۵ ٪ هیپوکلریت سدیم) به مدت یک دقیقه گندزدایی و پس از آن با آب مقطر سترون سه بار آبکشی شدند. به منظور سترون کردن میوه‌های نابالغ، میوه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا با آب معمولی و سپس در زیر دستگاه جریان هوا با محلول کلراکس ۱۰٪ (حاوی ۵/۲۵ ٪ هیپوکلریت سدیم) همراه با سه قطره مایع شوینده به مدت ۱۰ دقیقه گند زدایی و پس از آن با آب مقطر سترون سه بار آبکشی شدند. پیش از آنکه میوه‌ها در زیر دستگاه جریان هوا به صورت طولی برش داده شوند، به مدت چند ثانیه روی شعله قرار گرفتند.

انگیزش پینه

برای پینه زایی ریزنمونه‌ها، سه نوع محیط کشت MS، MT و H+H همراه با ۵ غلظت 2,4-D (۰و ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی گرم در لیتر) با pH روی ۵/۷ ±۰/۱ استفاده شد. منبع کربوهیدرات در تمامی محیط‌های کشت، ۳۰ تا ۵۰ گرم سوکروز بود. ۷ تا ۸ گرم در لیتر آگار برای جامدسازی محیطهای کشت مورد استفاده قرار گرفت و تمامی محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۸ دقیقه اتوکلاو شدند. در زمان کشت، برای هر ریزنمونه چهار تکرار (و در هر تکرار پنج ریزنمونه) در نظر گرفته شد. ظروف پتری‌دیش در شرایط دمایی ۲۸°C وبه مدت سه هفته در تاریکی کامل نگهداری شدند و نتایج تولید پینه، پس از ۲۱روز بر اساس شاخص استاندارد Hooker و Nabors با مقداری تغییر (اندازه پینه‌ها بین دو مقدار صفر یا عدم تشکیل پینه و ۱۰ به معنی بیشینه اندازه پینه یادداشت برداری گردید)، تخمین زده شد.

آنالیز آماری

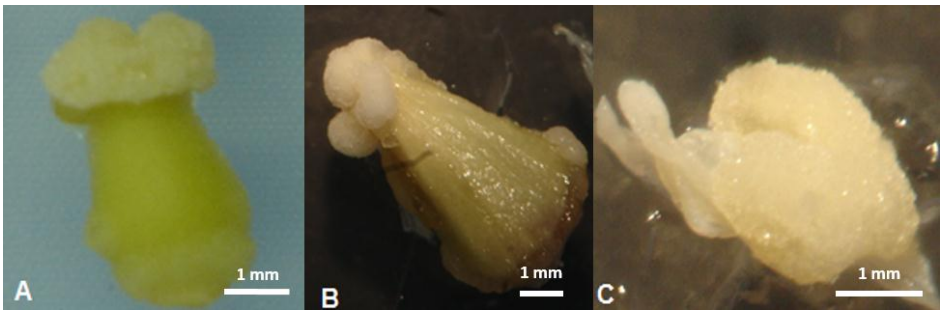
این پژوهش به صورت طرح فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۵ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال۵ درصد و به کمک آزمون LSD و نرم افزار NTSYS صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از گذشت ۲۱ روز از کشت ریزنمونه‌ها، بدون در نظر گرفتن محیط‌های کشت و غلظت‌های مختلف 2,4-D بیشترین میانگین انگیزش، به ترتیب در ریزنمونه‌های آبدانک (۶/۲۶) و کمترین میزان، در ریزنمونه‌های تخمک (۴/۰۲) مشاهده شد (جدول ۱). بیشترین تاثیر تنظیم کننده رشد 2,4-D در انگیزش پینه، در هر سه ریزنمونه مربوط به تیمار ۱ میلی گرم در لیتر بود که در ریزنمونه‌های تخمدان و تخمک تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (صفر میلی گرم در لیتر) و در ریزنمونه آبدانک با همه سطوح 2,4-D تفاوت معنی‌داری داشت. مقایسه میانگین اثر اصلی محیط کشت‌های مختلف بر میزان انگیزش پینه نیز نشان داد که بیشترین و کمترین میزان انگیزش، به ترتیب مربوط به محیط کشت MT (۵/۴۵) و H+H (۴/۳۹) بود. مقایسه تاثیر برهمکنش ریزنمونه، 2,4-D و محیط‌های کشت نشان داد که در ریزنمونه‌های تخمدان و آبدانک بیشترین انگیزش پینه به ترتیب ۸/۵۰ و ۱۰/۲۵، در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر 2,4-D روی محیط کشت MS و MT به دست آمد. در ریزنمونه تخمک بیشترین انگیزش، در تیمار ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4-D و مربوط به محیط کشت MT بود (جدول ۱). بررسی اثر برهمکنش محیط کشت و ریزنمونه بر میانگین اندازه پینه نشان داد که بیشترین

IrHC2019

میانگین انگیزش پینه در هر سه ریزنمونه تخمدان، تخمک و آبدانک مربوط به محیط کشت MT (به ترتیب ۵/۳۵، ۴/۷۱ و ۶/۲۹) و کمترین آن (به ترتیب ۴/۲۲، ۳/۰۵ و ۵/۹۰) مربوط به محیط کشت H+H بود (شکل ۲). در پینه‌زایی این پایه، ریزنمونه‌ها در سه هفته اول کشت، طیف عددی بین ۰ تا ۱۰ مقیاس هوکر و نی برز را نشان دادند (شکل ۱).



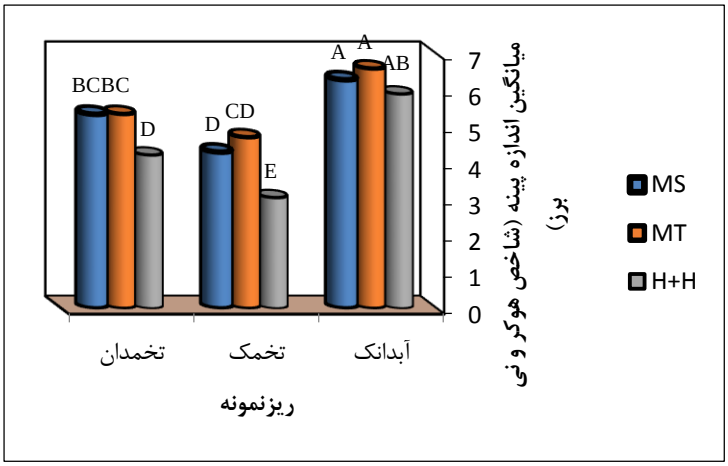
شکل «۱» A، B و C - به ترتیب انگیزش پینه در ریزنمونه‌های تخمدان، تخمک و آبدانک نابالغ لیسبون روی محیط کشت MT همراه با غلظت یک میلی گرم در لیتر 2,4-D بعد از ۲۱ روز.

جدول «۱» اثر سطوح مختلف 2,4-D بر میانگین انگیزش پینه از ریزنمونه‌های تخمدان،تخمک و آبدانک نابالغ لیسبون در سه محیط کشت MS، MT و H+H (استاندارد Hooker و Nabors).

ریز نمونه	2,4-D (mg/l)	محیط کشت MS	محیط کشت MT	محیط کشت H+H	میانگین ریزنمونه و 2,4-D	میانگین ریزنمونه
تخمدان	۰	۰/۰۰^{s}	۰/۰۰^{s}	۰/۰۰^{s}	۰/۰۰^{G}	
	۰/۵	۵/۷۳$^{i-o}$	۷/۲۶$^{c-j}$	۳/۸۵^{qr}	۵/۶۱^{DEF}	
	۱	۸/۵۰^{bc}	۶/۸۸$^{c-k}$	۵/۷۸$^{h-n}$	۷/۰۵^{BC}	
	۱/۵	۶/۴۲$^{d-m}$	۶/۳۸$^{e-m}$	۶/۰۶$^{g-n}$	۶/۲۹^{CD}	
	۲	۶/۰۷$^{g-n}$	۶/۲۱$^{e-m}$	۵/۴۳$^{k-q}$	۵/۹۰^{DE}	
						۴/۹۷^{B}
تخمک	۰	۰/۰۰^{s}	۰/۰۰^{s}	۰/۰۰^{s}	۰/۰۰^{G}	
	۰/۵	۴/۴۳$^{n-r}$	۶/۷۲$^{d-k}$	۳/۰۸^{r}	۴/۷۵^{F}	
	۱	۶/۶۸$^{d-l}$	۵/۶۸$^{j-p}$	۴/۰۶^{pqr}	۵/۴۷^{DEF}	
	۱/۵	۵/۴۱$^{k-q}$	۶/۱۰$^{f-m}$	۴/۱۱$^{o-r}$	۵/۲۰^{EF}	
	۲	۵/۰۰$^{m-q}$	۵/۰۶$^{l-q}$	۴/۰۱^{qr}	۴/۶۹^{F}	
						۴/۰۲^{C}
آبدانک	۰	۰/۰۰^{s}	۰/۱۸^{s}	۰/۰۰^{s}	۰/۰۶^{G}	
	۰/۵	۹/۲۵^{ab}	۷/۴۷$^{ec-g}$	۶/۳۷$^{e-m}$	۷/۷۰^{BC}	
	۱	۷/۸۵$^{b-e}$	۱۰/۲۵^{a}	۸/۰۷^{bcd}	۸/۷۲^{A}	
	۱/۵	۶/۹۳$^{c-k}$	۷/۷۵$^{b-f}$	۷/۶۸$^{b-g}$	۷/۴۵^{B}	
	۲	۷/۴۲$^{c-h}$	۷/۳۵$^{c-i}$	۷/۳۷$^{c-i}$	۷/۳۸^{B}	
						۶/۲۶^{A}
میانگین محیط کشت		۵/۴۲^{A}	۵/۴۵^{A}	۴/۳۹^{B}		

میانگین‌هایی که در هر ردیف یا ستون دارای حداقل یک حرف مشترک کوچک یا بزرگ هستند، اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD ندارند (حروف بزرگ اثرهای اصلی و حروف کوچک برهمکنش‌ها را نشان می دهند).

IrHC2019



شکل «۲» برهمکنش محیط کشت و ریزنمونه در تاثیر بر میانگین اندازه پینه در پایه لیسبون.

میانگین‌هایی که در ستون دارای حداقل یک حرف مشترک بزرگ هستند، اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ آزمون LSD ندارند (حروف بزرگ اثرهای اصلی را نشان می دهند).

انگیزش پینه در ریزنمونه‌های تخمدان، تخمک و آبدانک پایه لیسبون وابسته به حضور 2,4-D بود اگرچه واکنش ریزنمونه‌های مختلف به انگیزش پینه در غلظت‌های مختلف این تنظیم کننده رشد متفاوت بود.

2,4-D که در مرحله خاصی از چرخه یاخته‌ای نقش آغازگر را دارد، باعث بالا رفتن سرعت تقسیم یاخته‌ای شده و از آنجا که تنظیم کننده‌های رشد قادرند سنتز یا تخریب هورمون‌های درون‌زای همگروه خود و یا گروه‌های دیگر را تحت تاثیر قرار دهد، به عنوان مکمل هورمون‌های درون‌زای بافت‌های تخمدان و تخمک، باعث تشکیل پینه می‌شود. از طرف دیگر، بافت‌های گیاهی ممکن است اکسین را از طریق باند شدن، غیرفعال نموده و یا آن را اکسید نمایند (اکسیداسیون آنزیمی) اما 2,4-D نسبت به سایر اکسین‌ها کندتر به حالت باند شده و غیر فعال تغییر حالت می‌دهد و به همین دلیل تاثیر آن بر پینه زایی بیشتر است (علیزاده، ۱۳۹۰).

گزارش شده اسید سیتریک و آسکوربیک بر پینه‌زایی ریزنمونه‌های مرکبات موثر هستند (Unger and Feng, 1978). محتوای یاخته در ریزنمونه‌های آبدانک غنی از اسیدهای آلی به ویژه اسید سیتریک و آسکوربیک است، بنابراین می‌توانند در غیاب 2,4-D در انگیزش پینه تاثیرگذار باشند و یا به عنوان مکمل تنظیم کننده‌های برون‌زا مانند 2,4-D در تشکیل پینه موثر باشند. تشکیل نشدن پینه در آبدانک پایه لیسبون در غیاب 2,4-D نیز به احتمال، به میزان اسیدهای آلی بیان شده در آبدانک‌های این پایه وابسته است.

کیفیت تولید پینه‌ها به غلظت 2,4-D وابسته بود؛ در غلظت‌های پایین‌تر، پینه‌ها تردتر و در غلظت‌های بالاتر سفت و ظاهر شدند. پینه‌هایی که در عدم حضور 2,4-D تشکیل شده بودند حالت نرم و آبکی داشتند. شدت سیگنال‌های دریافتی توسط یاخته‌های بافت در مواجهه با 2,4-D در این ارتباط اثرگذارند (امین، ۱۳۹۳).

محیط کشت‌های مختلف MT،MS و H+H اثر متفاوتی در انگیزش پینه داشتند. اگرچه در هر سه محیط کشت، پینه تشکیل شد ولی میانگین انگیزش پینه در محیط کشت‌های مختلف، از نظر آماری تفاوت معنی داری داشت، به گونه‌ای که محیط کشت MT نسبت به محیط کشت H+H بیشترین میزان انگیزش پینه را نشان داد. با توجه به این که ترکیب نمک‌های محیط کشت H+H بر خلاف محیط کشت‌های MS و MT با نسبت برابر است و در این محیط کشت نسبت به دو محیط کشت دیگر از کربوهیدرات کمتری استفاده می شود، کمتر بودن میزان انگیزش پینه در این محیط کشت به احتمال می تواند ناشی از این تفاوت‌ها باشد.

منابع

IrHC2019

امین، ح. ۱۳۹۳. بررسی درون شیشه ای تنوع همگروه بدنی برای تولید ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در سه پایه مرکبات. پایاننامه دکتری، دانشگاه شیراز. ۲۲۴ ص.

فتوحی قزوینی، ر. و فتاحی مقدم، ج. ۱۳۸۹. پرورش مرکبات در ایران. انتشارات دانشگاه گیلان، ۳۰۵ ص.

علیزاده، م. ۱۳۹۰. راهنمای کاربران کشت بافت و ریزازدیادی. انتشارات نوروزی، ۳۲۲ص.

Kumar, G. and Richa, S. 2012. In Vitro Micropropagation of Different species of Citrus. Research Journal of Biotechnology, 7(4): 96-101..

Moore, G. A., Jacono, C. C., Neidigh, J. L., Lawrence, S. D. and Cline, K. 1992. Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports, 11: 238-242.

Sharma, S., Prakash, A. and Tele, A. 2009. In Vitro Propagation of citrus Rootstocks. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37(1): 84-88.

Unger, J. W. and Feng, K. A. 1978. Growth and differentiation of juice vesicles of orange grown In Vitro. American Journal of Botany, 65: 511–515.

Vardi, A., Frydman, A. S., Galun, E., Gonen, P. and Bliechman, S. 1990. Citrus cybrids- transfer of Micro Citrus organelles into Citrus cultivar. Acta Horticulturae, 280: 239-245.

Interaction of 2,4-D, type of explant and culture media on callus induction in Citrus limon Burm. ‘Lisbon’.

Hossein Amin[1*], Akhtar Shekafandeh[2]

[1]Assistant Prof. of Department of Plant Production, Darab College of Agriculture, Shiraz University, Shraz, Iran

[2]Associate Prof. of Department of Horticulture, Shiraz College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Corresponding author: hamin350@gmail.com

Abstract

Present study was carried out in a factorial in completly randomized design with four replications for finding the optimized interaction between culture media, explant and 2,4-D for callus induction in Citrus limon Burm. ‘Lisbon’. After strelization, the explants (unfertilized ovary, ovules and juice vesicles) were transferred from fruits to MS, MT and H+H media completed with 2,4-D (0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mg l^{-1}) .Comparison of interaction between explants, 2,4-D and culture media indicated that the highest callus induction was obtained from ovaries and juice vesicles cultured on MS and MT media completed with 1 mg l^{-1} 2,4-D and in ovules on MT medium completed with 0.5 mg l^{-1} 2,4-D. In conlussion quality and quantity of callus depended on culture media, 2,4-D concentrations and types of explant.

Key words: Culture Medium, Juice Vesicle, Plant Growth Regulator

IrHC2019