اثر تنظیم کننده‌های رشد بر باززایی شاخسارهای نابجا از محور روی لپه پرتقال Citrus sinensis L.) Osbeck) رقم ایتالیایی

خاطره ا سدی1، ویدا چالوی2*

1-دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، 2- استادیار گروه باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، صندوق پستی 578، ساری، مازندران،

v.chalavi@sanru.ac.ir

چکیده

مرکبات از مهم ترین محصولات باغبانی جهان هستند. با بهره‌گیری از روش‌های بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن به گیاهان، می‌توان به برنامه‌های اصلاحی و در نتیجه بهبود ویژگی های رقم‌های مرکبات سرعت بخشید. توسعه یک سیستم باززایی بالا برای گیاه مورد نظر، اولین قدم در انتقال ژن به گیاهان می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نحوه قرار گیری ریز نمونه در محیط کشت بر درصد بازایی اپیکوتیل پرتفال رقم ایتالیایی است. به این منظور، بذر های میوه بالغ پرتقال رقم ایتالیایی، پس از ضدعفونی و پوست کندن درمحیط کشت 1/2 موراشگی و اسکوگ (MS) کاشته شدند. پس از سه هفته قطعات اپیکوتیل‌های رشد یافته، به طول 1 سانتیمتر جدا شده و در محیط کشت MS، حاوی بنزل آمینو پورین(BAP) با نسبت‌های صفر، 1 ، 2 یا 4 میلی‌گرم در لیتر، در ترکیب (به ترتیب) با نسبت‌های صفر، 0/1 ، 0/2 یا 0/4 میلی‌گرم در لیتر ایندول بوتریک اسید (IBA) انتقال یافتند. بر اساس نتایج بدست امده، از نظر ظریب ازدیاد و تعداد شاخه‌ها، در مقایسه ی غلظت های گوماگون BAP و IBA، بیشترین ضریب باززایی مر بوط به غلظت 2 میلی گرم در لیترBAP و 0,2 میلی گرم در لیتر IBA بود .همچنین ریز نمونه هایی که درجهت افقی قرار داشتند بیشر تولید کالوس نمودند، در حالیکه ریز نمونه هایی که درجهت مایل قرار داشتند، بیشتر تولید شاخه کردند.

واژه‌های کلیدی: بازایی، مرکبات ،پرتقال رقم ایتالیایی، BAP ,IBA

مقدمه

مرکبات از مهمترین و محبوب‌ترین میوه‌ها در سراسر دنیا هستند که کشت و تولید آن‌ها به صورت بخش مهمی از صنعت باغبانی در امده است و رو به گسترش می‌باشد. از انجا که بهبود ویژگی‌های درختان میوه به روش‌های کلاسیک نیاز به زمان دراز دارد، بسیاری از کارشناسان اصلاح گیاهان برای اصلاح درختان میوه به روش‌های نوین بیونکنولوژی رو آورده‌اند. با استفاده از این روش‌ها، مانند انتقال ژن به گیاهان، می‌توان در زمانی کوتاه صفات مورد نظر را به گیاهان موجود با سایر ویژگی‌های مطلوب افزود. باززایی شاخاسارهای نابجا، پیش نیاز انتقال ژن به گیاهان با استفاده از سیستم کشت بافت گیاهی است (۳،۴).

سیتو کین‌ها مهمترین تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای شاخه زائی رقم های مرکبات هستند (3). در پژوهشی، باززائی اپی‌کوتیل-های پرتقال در مقابل 1,8 میلی گرم در لیتر BAP بهترین نتیجه را داد (2). توصیه شده است که از BAP به تنهایی و یا همراه با نقتالین استیک اسید (NAA) برای باززائی ریز نمونه‌های پرتقال ستفاده شود (4). در چهار رقم مرکبات، بهترین تیمار شاخه زائی در حضور 2,2 میلی گرم در لیتر BAP و 0,54 میلی گرم در لیتر اکسین بوده است (1). کاربرد تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در خد بهینه سبب افزایش باززائی در مرکبات می شود، چنانچه تفاوت های کوچک در مقدار BAP می تواند اثرات بزرگی را روی پاسخ گیاه به باززائی داشته باشد (3). افزون بر داشتن تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در نسبت‌های بهینه، نحوه قرار گیری ریز نمونه در بستر کشت هم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. در آزمایش که بر روی نحوه قرار گیری ریز نمونه در بستر کشت صورت گرفت، بیشرین باززایی در ریزنمونه‌هایی مشاهده شد که بصورت عمودی در محیط کشت بافت قرار داشتند (1). تا انجا که ما

اطلاع داریم، تا کنون مطالعه‌ای در مورد باززایی پرتقال رقم ایتالیائی، که یکی از مهمترین رقم‌های پرتقال در مازندران است صورت نگرفته است. بنابراین در پژوهش، حاضر، اثر نسبت های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی سیتوکینین، BAP و اکسین، ایندول بوتریک اسید (IBA) و هم چنین نحوه قرار گیری ریز نمونه در بستر کشت برای باززائی پرتقال رقم ایتالیائی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی و شرایط محیطی نگهداری کشت‌ها

بذر های پرتقال رقم ایتالیایی بلافاصله پس از خروج از میوه ها، در اتانول 96% به مدت 10 ثانیه آتش زده شدند.سپس در شرایط استریل و در زیر دستگاه لامینار ایر ارفلو پوست بذر کنده شد و در محیط کشت بافت 1/2 موراشگی و اسکوگ (MS) کشت شدند. بذرهای کشت شده در محیط MS 1/2 در دمای 25°C به مدت 3 هفته در تاریکی نگهداری شدند.. پس از سه هفته تهال-های بذری رشد یافته از محیط کشت بیرون آورده شدند و ریز نمونه‌ها از اپیکوتیل گیاهچه‌ها به طول 1 سانتی متر تهیه شده و به محیط‌های دارای تنظیم کننده‌های رشد گیاهی با نسبت‌های گوناون BAP (0، 1 ، 2 و 4 میلی‌گرم در لیتر) به ترتیب در ترکیب با نسبت‌های (0، 0/1 ، 0/2 و 0/4 میلی‌گرم در لیتر) IBA انتقال یافتند. در هر ظرف، 5 ریز نمونه به صورت مایل یا افقی قرار گرفت. ظروف محتوی کشت در اتاق رشد با دمای 25°C و فتوپرید 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از 50 روز ضزیب ازدیاد (میانگین تعداد شاخه تقسیم بر تعداد ریز نمونه) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین زمان کالوس دهی و اولین شاخه نابجا و تعداد شاخه در هر محیط بررسی شد.

نتایج

کاربرد آتش برای از بین بردن آلودگی های سطحی قارچی و باکتریایی کاملا موثر بود، هیچکدام از کشت ها الودگی نشان ندادند. هم‌چنین کندن پوست مرکبات در شتاب دادن به جوانه‌زنی بذرها بسیار مفید بود و کلیه بذرها پس از سه و یا چهار روز جوانه زدند و پس از دو هفته تولید نهال‌های به طول حدودا 12 سانتی‌متر نمودند. بر اساس نتایج بدست امده، از نظر ظریب ازدیاد و تعداد شاخه‌ها، تفاوت قابل توجهی در بین چهار تیمار بکار رفته تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در پرتقال ایتالیایی مشاهده شد (جدول 1) . در مقایسه ی غلظت های 0 و 1و 2 و4 میلی گرم در لیتر BAP و 0 و0,1 و0,2 و0,4 میلی گرم در لیتر IBA بیشترین ضریب ازدیاد به غلظت 2 میلی گرم در لیترBAP و 0,2 میلی گرم در لیتر IBA تعلق داشت. (شکل 1 c).

تیمار 1 میلی گرم در لیتر BAP و 1/ 0میلی گرم در لیتر IBA تاثیر مطلوبی در شاخه زائی نداشت. همچنین نتایج نشان داد که تشکیل اولین کالوس و اولین شاخه نابجا در تیمار 2 میلی گرم در لیتر BAP و2/. میلی گرم در لیتر IBA بوده است. در ریزنمونه هایی که به صورت مایل در محیط کشت قرار داشتند حدودا سه هفته زودتر از ریزنمونه هایی که به صورت افقی قرار داشتند شاخه زایی انجام شد.در ریز نمونه هایی که به صورت افقی قرار دارندکالوس دهی بیشتر مشاهده شد.همچنین در هر دوی آنها اولین بازایی مربوط به غلظت 2 میلی گرم در لیتر BAP و2/. میلی گرم در لیتر IBA تعلق داشت. (شکل2).

جدول 1 : مقایسه ی ضریب ازدیاد و تعداد شاخه در اثر مقادیر BAP و IBA

تیمار	ضریب ازدیاد	تعداد شاخه
BAP(0), IBA(0)	0,2	5
BAP(1), IBA(0.1)	0,12	3
BAP(2), IBA(0,2)	0,68	17
BAP(4), IBA(0.4)	0,24	6

شکل 1 : شاخه زائی در محیط کشت بافت با استفاده از اپی کوتیل پرتقال ایتالیایی ، A: (0)BAP . B: (1میلی گرم در لیتر)BAP .C: (2 میلی گرم در لیتر)BAP .D: (4 میلی گرم در لیترBAP)

شکل2:طرز قرارگیری ریزنمونه در محیط کشت:(A :ریزنمونه به فرم مایل.B: ریزنمونه به فرم افقی)

بحث

در این مطالعه مشاهده شد که تیمار 2 میلی گرم در لیترBAP اثر افزاینده بر ضریب ازدیاد و تعداد شاخه دارد و 1میلی گرم در لیترBAP تاثیر چندانی بر ضریب ازدیاد و تعداد شاخه ندارد. این نتایج با نتایج Kobayashi و همکاران (2002) که بیشترین تعداد شاخه‌های باززایی شده را در حضور 1,8میلی گرم در لیترBAP بدست آوردندهمخوانی دارد. همچنین با نتایج Bordon و همکاران (2000) که بیشترین تعداد شاخه زایی را در حضور2,2 میلی گرم در لیتر BAP بدست اوردند همخوانی دارد در مقایسه غلظت های 0 و 1و 2 و4 میلی گرم در لیتر BAP و 0 و0,1 و0,2 و0,4 میلی گرم در لیتر IBA، پافزایش میزان BAP تاثیر معنی داری بر ضریب ازدیاد و تعداد شاخه نداشت زیرا در تیمار 4 میلی گرم در لیترBAP و 4/. میلی گرم در لیتر IBA منجر به افزایش ضریب ازدیاد و تعداد شاخه نشد. بنابراین با کاربرد نسبت های مناسب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، میتوان ضریب ازدیاد و تعداد شاخه را افزایش داد. همچنین در این پژوهش مشاهده شد، ریزنمونه هایی که بصورت عمودی در محیط کشت قرار گرفتندکالوس

دهی کمتر و شاخه زایی بیشتری دارند. این نتایج با یافته‌های Bordon و همکاران (2000)که در مورد جهت قرار گیری ریز نمونه در محیط کشت انجام شد همخوانی دارد بنابراین با نتایج به دست آمده نشان داد که امکان افزایش شاخه‌زایی و ضریب باززایی با انتخاب غلظت های مناسب تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در پرتقال رقم ایتالیایی وجود دارد.

منابع

1 – Bordon,Y., J.L. Guardiola, A. Garcia-Luis. 2000.Genotype affects the morphogenic response in vitro of epicotyl segments of Citrus rootstocks. Ann. Bot.86:159–166.

2- Kobayashi,A.K, J.C. Bespalhok, L.F. Pereira, and L.G.E. Vieira. 2003. Plant regeneration of sweet orange (Citrus sinensis) from thin sections of mature stem segments. PlantCell,Tissus and Organ Culture.74:99-102.

3- Niedz, R.P., T.J. Evens 2011. The effects of benzyladenine and meta-topolin on in vitro shoot regeneration of sweet orange. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 6:64-73.

4 -Marutani-hert, M.,M. Bowman,K.D. McCollum,G.T. Mirkov,T.E. Evens,T.J. Niedz,R.P. 2012. A Dark Incubation Period Is Important for Agrobacterium-Mediated Transformation of Mature Internode Explants of Sweet Orange, Grapefruit, Citron, and a Citrange Rootstock. PLOS ONE journal.7(10): e47426.

Effect of plant growth regulators on epicotyl adventitious shoot regeneration of sweet orange (Citrus sinensis L. Osbeck) cv. Italian

Kh. Asadi1 and V. Chalavi*1

1Department of Horticulture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, PO-Box 578;

v.chalavi@sanru.ac.ir

Abstract

Citrus are among the most important horticulture crop plants. Taking advantage of biotechnology methods such as plant gene transformation can accelerate citrus cultivar improvement programs. Development of a high regeneration system is the first step in plant gene transformation. The goal of present study was to evaluate the effects of plant growth regulators and explants position on culture media for improving regeneration percentages of sweet orange, cv. Italian. Toward this end, seeds of mature fruits of sweet orange cv. Italian, after being disinfected and peeled, were cultured on half strength Murashige and Skoog (MS) medium. After three weeks, 1 cm pieces of grown epicotyls were transferred to MS medium containing 0, 1, 2 or 4 mg L-1 of 6-benzyladenine (BA) in combination with (respectively) 0, 0,1, 0.2 or 0,4, mg L-1 indole-3-butyric acid (IBA). According to obtained results, regarding regeneration rates and number of shoots in different concentrations of BA and IBA, the highest regeneration rate belonged to 2 mg L-1 BA and 0,2 mg L-1 IBA. In addition, those explants that were positioned horizontally mostly produced callus, while those explants which were positioned vertically mostly produced shoots.

Keywords; regeneration, citrus, sweet orange, cv. Italian, BA, IBA,