تعیین مناسبترین غلظت هورمونی جهت ریزازدیادی پرتقال رقم محلی مازندران (.Citrus sinensis Osbeck)

علی قنبری1، علی دهستانی کلاگر2، محمدرضاکریمی3*
کارشناس ارشد بیوتکنولوژی ، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی، ساری
استادیار ، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری تبرستان، ساری
دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد سبزوار
*نویسنده مسئول mo.karimi59@gmail.com

چکیده

به منظور مطالعه شرایط باززایی پرتقال رقم محلی مازندران، ریزنمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل از گیاهچه‌های تولید شده درون شیشه تهیه گردید. ریز نمونه‌ها در محیط کشت موراشی و اسکوگ (موراشی و اسکوگ، 1969) با پنج غلظت مختلف از هورمون 6- بنزیل آدنین (BA)، (0، 0/5، 1، 2 و 3 میلی گرم بر لیتر) و 4 غلظت متفاوت از هورمون ایندول 3- بوتریک اسید (IBA)، با غلظتهای (0، 0/2، 0/5 و 1 میلی گرم بر لیتر) بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار کشت شدند. صفات مورد بررسی شامل تعداد نمونه‌های واکنش داده به محیط کشت، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده و طول ساقه گیاهچه‌های باززایی شده بودند. از بین غلظت‌های متفاوت هورمونی متفاوت مورد مطالعه، محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BA و بدون IBA بهترین نتایج را برای تعداد نمونه‌های واکنش داده و تعداد گیاهچه‌های باززایی شده نشان داد. همچنین ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل در تمامی تیمارها برتری معنی داری را از نظر باززایی نسبت به هیپوکوتیل‌ها نشان دادند. شاخه‌های تولیدی در محیط IBA نیز با غلظت یک میلی‌گرم برلیتر بیشترین میزان ریشه زایی را داشت. در حالیکه طویلترین و طبیعی‌ترین ریشه‌ها در محیط بدون اکسین تولید شدند که احتمالاً به دلیل وجود اکسین درون بافتی در ریز نمونه‌ها می‌باشد. بطورکلی نتایج این مطالعه نشان دادکه محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA به تنهایی قادر به باززایی رقم محلی می‌باشد.

کلمات کلیدی: پرتقال رقم محلی، بنزیل آدنین، ایندول بوتریک اسید، باززایی درون شیشه‌ای.

مقدمه

مرکبات یکی از محصولات باغی مهم جهان بشمار می‌آید و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می‌شود. سالانه بیش از 124 میلیون تن مرکبات در سراسر جهان تولید می‌شود، (فائو، 2011). مرکبات از تیره Rutaceae، زیر تیره Aurantioidae، قبیله Citrae و زیر قبیله Citrinae می‌باشند که در طبقه بندی تاناکا شامل 33 جنس و بیش از 162 گونه می‌باشند (فتوحی و فتاحی، 1385). اکثر انواع زیر کشت مرکبات از جنس Citrus بوده که خود شامل چندین گروه می باشد. و ارقام پرتقال محلی نیز در این گروه‌بندی قرار می-گیرند. گیاه مرکبات به دلیل چوبی بودن به سختی باززایی شده و گیاهچه کامل تولید می‌کند. که این گیاهچه‌های کامل برای مهندسی ژنتیک کاربرد مطلوبی دارند. قابلیت تولید گیاهچه‌های کامل از ریزنموهای مختلف مرکبات در شرایط آزمایشگاهی توسط گروه‌های متعددی بررسی شده است (دوران ویلا و همکاران، 1992؛ گروبل و همکاران، 1998). همچنین ریزنمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل به دلیل قابلیت باززایی بالا، موضوع تحقیقات زیادی بوده‌اند (البحرانی، 2002؛ کوستا و همکاران، 2004؛ هیرگودار و همکاران، 2005). رقم محلی یکی از انواع پرتقال های محلی بومی ایران، با خصوصیات ویژه و عطر و طعم مطلوب است که با شرایط آب و هوایی و بیماری‌های عمده منطقه شمال کشور سازگار می باشد. با توجه به اینکه تاکنون بررسی دقیقی در مورد کشت بافت و نیازهای رشدی این رقم صورت نگرفته است، هدف این تحقیق معرفی روشی موثر و عملی جهت باززایی مستقیم گیاهچه از نمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل توسط ترکیبات مختلف هورمونی در رقم محلی می‌باشد. معرفی روشی استاندارد جهت باززایی این رقم محلی می‌تواند راه برای سایر محققین جهت دستورزی ساختار ژنتیکی این رقم هموار کند.

مواد و روش‌ها

بذرهای پرتقال محلی جمع‌آوری شده از کلکسیون مرکبات (رامسر) پس از شستشو، ضدعفونی شده و جهت تولید گیاهچه‌های استریل به محیط کشت MS انتقال داده شدند. پس از جوانه زدن و رشد بذور، گیاهچه‌های تولید شده به عنوان منبع گیاهی جهت تهیه ریز نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. ناحیه اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل گیاهچه‌های استریل برای تهیه ریزنمونه استفاده گردید. آزمایش بصورت فاکتوریل و بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتور هورمون BA (6- بنزیل آدنین) در پنج غلظت (0، 0,5، 1، 2 و 3 میلی گرم در لیتر) و هورمون IBA (ایندول 3- بوتریک اسید) در چهارغلظت (0، 0,2، 0,5 و1 میلی گرم در لیتر) اعمال گردید. جهت بررسی تیمارهای هورمونی صفاتی همچون تعداد نمونه‌های باززایی شده، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده و طول ساقه مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت انتقال شاخه‌های نابجا به محیط‌های ریشه‌زایی برای القاء ریشه از محیط حاوی هورمون‌های NAA و IBA با غلظت‌های یک و نیم میلی‌گرم بر لیتر و محیط بدون هورمون استفاده گردید. بطوریکه ابتدا واکنش در محیط بدون هورمون بعد از گذشت دو هفته به ترتیب در محیط‌های IBA و بعداز گذشت سه هفته درNAA صورت گرفت. داده‌های حاصل از این مطالعه توسط برنامه Excel و نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جدول تجزیه واریانس (ANOVA) صفات انجام شد و اختلاف بین میانگین‌ها با روش t- استودنت و مقایسه میانگین‌ها نیز توسط آزمون توکی (HSD) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

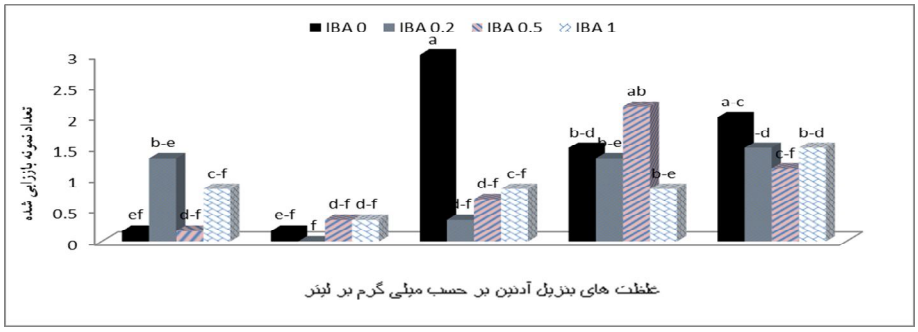
نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه نظیر تعداد نمونه‌های باززایی شده، تعداد گیاهچه‌های باززایی شده و طول ساقه نشان داد که سطوح مختلف هورمون BA برای صفات مورد ارزیابی اثرات معنی‌داری را در سطح آماری 1% را نشان دادند. سطوح متفاوت هورمون IBA نیز برای صفات تعداد نمونه‌های باززایی شده و تعداد گیاهچه‌های باززایی شده اثرات معنی داری را نشان داد اما برای صفت طول ساقه اثر معنی داری را نشان نداد. مطالعه اثرات متقابل دو سطح هورمون BA و IBA نیز اثر معنی‌داری را برای صفات تعداد نمونه‌های باززایی شده و تعداد گیاهچه‌های باززایی شده نشان داد درحالیکه برای صفت طول ساقه اثر معنی‌داری نداشتند (جدول 1). مقایسه میانگین بین سطوح تیمارهای هورمونی که بیشترین تعداد نمونه و گیاهچه باززایی شده از ترکیب تیمار یک میلی‌گرم BA و بدون استفاده از هورمون IBA حاصل می‌شود (جدول 2). این نتایج با گزارشات انجام شده توسط آلمیدا و همکاران (2002)، گروبل و همکاران (1998) و بوردن و همکاران (1989) نیز مطابقت داشت. همچنین بررسی دو ریزنمونه اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل مورد مطالعه توسط آزمون t-student نشان داد که ریزنمونه اپی‌کوتیل در تمامی صفات مورد بررسی (تعداد نمونه‌های باززایی شده، تعداد گیاهچه-های باززایی شده و طول ساقه) برتری معنی‌داری را از نظر باززایی نسبت به هیپوکوتیل‌ها نشان دادند (جدول 3 و شکل‌های 1، 2 و 3). در این راستا تحقیقات زیادی بر روی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل به دلیل قابلیت باززایی بالا، انجام شده است. البحرانی (2002)؛ کوستا و همکاران (2004)؛ هیرگودار و همکاران (2005) و یانگ و همکاران (2006) نیز گزارش کردند که در جریان باززایی کلیه سطوح تیمارها، قطعات اپی‌کوتیل از قدرت باززایی بهتری نسبت به هیپوکوتیل برخوردار می باشد. در گزارش های متعددی نیز هورمون سیتوکنین BA به عنوان کاراترین هورمون موثر در باززایی شاخه های نابجا در مرکبات معرفی شده است (ماگون وسینگ، 1995؛ کوستا و همکاران، 2005). لازم به ذکر است در برخی گزارشات اثرات بالای دو میلی‌گرم بر لیتر BA برای انواع گونه های مختلف مرکبات دارای اثرات کالوس زایی معرفی شده است (یانگ و همکاران 2006)، که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت داشت. بررسی‌های انجام شده توسط آلمیدا و همکاران (2002) نیز نشان داده شد که ارقام والنسیا، ناول و پرتقال شیرین به ترتیب با 75% ، 85% و 72% پاسخ دهی به باززایی را در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP به تنهایی نشان دادند. همچنین گزارش کردند که کمترین تعداد ریزنمونه باززایی شده در غلظت نیم میلی‌گرم BA و 0/02 میلی گرم IBA بر لیتر وجود داشت. در مطالعه‌ای که بر روی لیمو انجام شده نیز هورمون BA نیز به تنهایی برای تولید شاخه‌های نابجا کافی مناسب گزارش شده است (هیرگودار و همکاران، 2005). بررسی القاء ریشه از محیط حاوی هورمون‌های NAA و IBA با غلظت‌های یک و نیم میلی‌گرم بر لیتر و محیط بدون هورمون نشان داد که در محیط بدون هورمون میانگین تعداد ریشه‌ها 1/5 عدد با طول میانگین 7/5 سانتیمتر بدست آمد. در محیط NAA با غلظت‌های نیم و یک میلی‌گرم بر لیتر ابتدا توده زرد رنگ کالوس بدست آمد و سپس ریشه‌های طبیعی نمایان شدند. میانگین تعداد ریشه‌ها به ترتیب 5/2 و 5/9 عدد و میانگین طول ریشه‌ها 2/1 و 3/4 سانتیمتر اندازه‌گیری شد. این در حالیست که ریشه‌های طبیعی و شاداب در محیط بدون هورمون نمایان شدند. در حالیکه در محیط‌های حاوی IBA با غلظت‌های نیم و یک میلی‌گرم بر لیتر نیز ریشه-های طبیعی بوجود آمد و میانگین تعداد ریشه‌ها به ترتیب 5/2 و 6/2 و میانگین طول ریشه‌ها نیز 6/5 و 7/5 به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهند که غلظت IBA با یک میلی‌گرم بر لیتر بهترین محیط ریشه‌زایی برای رقم محلی می‌باشد. با این حال در سایر گونه‌های مرکبات ریشه‌زایی توسط سطوح مختلفی از NAA، IBA و IAA گزارش شده است. این تحقیقات نتایج متفاوت و گاهی متضادی را نسبت به نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند. بطوریکه هیرگودار و همکاران، (2005)، NAA را در تولید ریشه موثرتر از IBA دانسته بود که با نتایج ما مغایرت داشت. البهرانی (2002) نیز NAA را در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر موجب کاهش تولید ریشه گزارش کرد. به نظر می‌رسد این تفاوت به دلیل اختلاف ژنتیکی بین این ارقام پرتقال می‌باشد.

نتیجه گیری

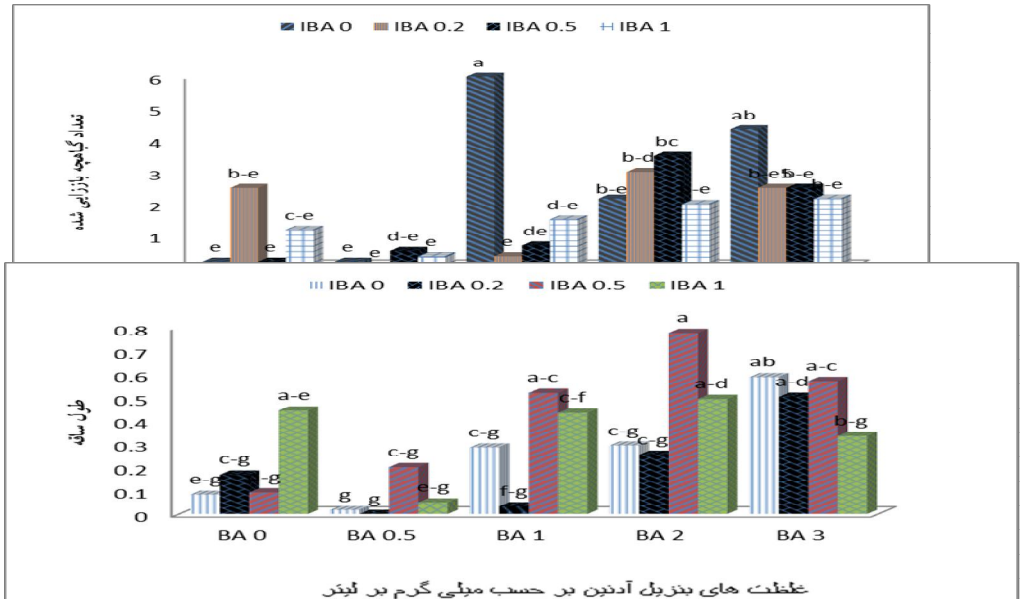
از بین هورمون‌های مورد استفاده در محیط‌های کشت القایی جهت باززایی، دو هورمون BA و IBA از مهمترین و کاربردی‌ترین هورمون‌های باززایی محسوب می‌شوند. نتایج این مطالعه برای بررسی بهترین محیط کشت باززایی در پرتقال محلی رقم محلی نشان داد که سطح هورمونی حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA به تنهایی قادر به باززایی در این رقم می‌باشد. شاخه‌های تولیدی در محیط IBA نیز با غلظت یک میلی‌گرم برلیتر بیشترین میزان ریشه زایی را داشت. در حالیکه طویلترین و طبیعی‌ترین ریشه‌ها در محیط بدون اکسین تولید شدند، که احتمالاً به دلیل وجود اکسین درون بافتی در ریز نمونه‌ها می‌باشد. بطورکلی نتایج این مطالعه نشان داد که محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر هورمون BA به تنهایی قادر به باززایی رقم محلی می‌باشد.

جدول 1- نتایج میانگین مربعات صفات مورد ارزیابی

منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	صفات		
		تعداد نمونه باززایی شده	تعداد گیاهچه باززایی شده	طول ساقه
هورمون BA	4	**9/19	**43/97	**0/74
هورمون IBA	3	**3/35	**18/68	n.s0/22
BA* IBA	12	**3/89	**20/7	n.s0/11
خطای آزمایش	40	0/82	5/08	0/08



شکل 1- مقایسه میانگین ها برای تعداد نمونه‌های باززایی شده



شکل 4- مراحل مختلف باززایی ریزنمونه‌های اپی کوتیل.

جدول 2- مقایسه میانگین بین اثرات متقابل هورمون BA و IBA به روش آزمون توکی در سطح احتمال 0/05 درصد

تیمارهای هورمونی		تعدادنمونه	تعداد گیاهچه
BA	IBA		
0	0	cd0/33	c0/33
0	0/2	abcd2/67	abc5
0	0/5	cd0/33	c0/33
0	1	bcd0/67	bc1/33
0/5	0	cd0/33	c0/33
0/5	0/2	d0	c0
0/5	0/5	bcd0/67	c1
0/5	1	bcd0/67	c0/67
1	0	a4/67	a10/67
1	0/2	bcd0/67	c0/67
1	0/5	bcd1	c1
1	1	bcd1/33	bc2/33
2	0	abcd2/67	abc4
2	0/2	abcd2/67	abc6

2	0/5	abc3	abc5/33
2	1	bcd1	bc3/33
3	0	ab3/33	ab8
3	0/2	abcd2/33	abc4
3	0/5	bcd1/33	bc3/67
3	1	abcd2/67	abc4

جدول 3- مقدار t برای صفات مورد ارزیابی در نوع ریز نمونه

صفات مورد بررسی	مقدار t
تعدادنمونه باززایی شده	3/99 **
تعداد گیاهچه تولید شده	4/01 **
طول ساقه	3/8 **

*و ** به ترتیب معنی دار در سطح آماری 5% و 1%

منابع

Al-Bahrany, A.M., 2002, Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime Citrus aurantifolia (Christm.) Swing. Sci. Hort. 95:285–295.

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

Costa, M.G.C., Alves, V.S., Lani, E.R.G., Mosquima, P.R., Carvalho, C.R. and Otoni, W.C., 2004, Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of Citrus. Sci. Hort. 100: 63-74.

Duran-Vila, N., Gogorcena, Y., Ortega, V., Ortiz, J. and Navarro, L., 1992, Morphogenesis and tissue culture in sweet orange (Citrus sinensis L. Osb.): effect of temperature and photosynthetic radiation. Plant Cell Tissue & Organ Cult. 29:11–18.

Duran-Vila, N., Ortega, V., Navarro, L., 1989, Morphogenesis and tissue cultures of three Citrus species. Plant Cell Tissue & Organ Cult. 16, 123–133.

FAO Commodities and Trade Division. 2011, Fresh and Processed Citrrus fruit annual Statistics Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy.

Ghorbel R, Dominguez A, Navarro L and Pena L., 2000, High efficiency genetic transformation of sour orange Citrus aurantium L. and production of transgenic trees containing the coat protein gene of Citrus Tristeza Virus. Tree Physiol., 20: 1183-1189.

Hiregoudar, L.V., Ashok Kumar, H.G. and Murthy, H.N., 2005, In vitro culture of Feronialimonia L. Swingle from hypocotyl and internodal explants. Biol. Plant. 49: 41-45.

Kaneyoshi, J.,Kobayashi, S.,Nakamura, Y.,Shigemoto, N.,Doi, Y., 1994, A simple and efficient gene transfer system to trifoliate orange (Ponicirus trifoliata Raf.). Plant Cell Rep. 13, 541–545.

Moore GA, Febres VJ, Niblett CL, McCaffery Luth D and Garnsey SM., 2000, Agrobacterium-mediated transformation of grapefruit (Citrus paradisimacf.) with genes from citrus tristeza virus. Acta Hort. 535: 237-243.

Shawkat, Bushra, M., 2006, Micropropagation of rough lemon (Citrus jambhiri Lush.): Effect of explants type and hormone concentration. Acta Bot. Croat. 65 (2), 137–146

Yang, L., Xu, C.J., Hu, G.B. and Chen, K.S., 2006, Direct shoot organogenesis and plant regeneration in Fortunella crassifolia. Biol. Plant. 50: 729-732.

In vitro culture and plantlet regeneration from different explants of Mazandaran local citrus orange (Citrus sinensisOsbeck.)

Abstract:

In order to study in vitro culture requirements for Mazandaran local Citrus orange (Citrus sinensis Osbeck.), various explants including epicotyls and hypocotyls were cultured on Murashige and Scook basal medium (1969) supplemented with Benzyladenine (BA) at 0, 0,5, 1, 2 and 3 mg L-1 along with four concentrations of Indole-3-butyric acid (IBA) (0, 0,2 0,5 and 1 mg L-1) as factorials in a completely randomized design with 3 replications. Different traits including, the rate of explants responding to each medium and shoot length and number of regenerated plantlets were analyzed using SAS statistical software. Results showed that the highest rate of explants response was achieved in a medium fortified with 1 mg L-1 BA deprived of IBA. The highest regeneration efficiency was also observed in the same medium. The maximum shoot length for regenerated plantlets was observed in media with 2 mg L-1 BA and 0,2 mg L-1 IBA. Regarding the explants type, compared to hypocotyls, epicotyls showed higher regeneration ability in all tested media. The regenerated shoots were then transferred to rooting media including hormone free media and media supplemented with different concentrations of IBA or NAA. Results

indicated that the highest number of roots was developed in medium supplemented with 1 mg L-1 IBA, while the longest roots were observed in hormone free media.
Keywords: Local citrus cultivar, in vitro culture, phytohormones, regeneration.