مطالعه ضد عفونی و کالزایی برگ درخت انبه رقم محلی مشک در شرایط درون شیشه ای

سید محمد شتاب بوشهری (۱)، سید علی قائم مقامی (۲)، سید محمود طالبی (۳)

۱-کارشناس ارشد باغبانی گروه تولیدات گیاهی پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، ۲-کارشناس ارشد باغبانی و عضو هیأت علمی گروه تولیدات گیاهی پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران،۳-کارشناس باغبانی مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان میناب

به منظور کالزایی در تکثیر غیر جنسی انبه، برگهای جوان درخت انبه رقم محلی مشک، تحت تیمارهای ضد عفونی سطحی و کالزایی قرار گرفته و روی محیط کشت MS تغییر یافته حاوی ترکیبهای مختلف هورمونی کشت شده و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. نمونه ها جهت حذف اثرات نامطلوب مواد فنولی هر سه روز یک بار به محیط کشت مشابه و جدید منتقل می شدند. از نمونه های آلوده و سوختگی ناشی از مواد ضد عفونی کننده و کالزایی قطعات برگی کشت شده، آمارگیری بعمل آمد. ترکیبهای هورمونی شامل هورمونهای BA، TDZ وNAA با غلظت های متفاوت و محلولهای ضد عفونی برگها شامل هیپوکلریت سدیم ۱٪ ، کلرید جیوه ۰/۰۵٪ و الکل اتیلیک ۵۰٪ با زمانهای مختلف بود. نتایج نشان داد از بین تیمارهای ضد عفونی، کلرید جیوه ۰/۰۵٪ با زمان ۱۰ دقیقه کمترین اثرات سوختگی و پایین ترین میزان آلودگی را نشان می داد و از بین تیمارهای هورمونی، تیمار NAA و BA با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر BA و ۱ میلی گرم در لیتر NAA جهت کالزایی برگی مناسب تر از دیگر تیمارها بود.

کلمات کلیدی: کالزایی،برگ انبه ، کشت بافت، مواد فنولی.

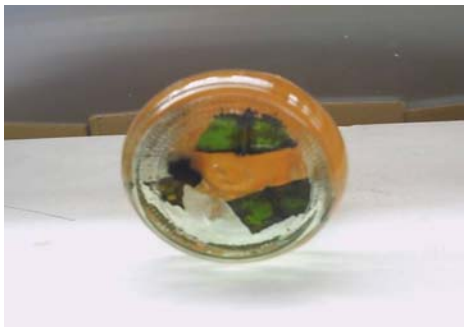
مقدمه:

انبه یکی از مهمترین میوه های گرمسیری است که هم اکنون سهم عمده ایی از محصولات باغی دنیا را به خود اختصاص داده و طبق گزارشات FAO سازمان خواروبار کشاورزی ملل متحد بعد از موز، مرکبات ، انگور و سیب پنجمین میوه مهم دنیا از نظر میزان تولید می باشد. یکی از روش های جدید تکثیر غیر جنسی انبه، ریزازدیادی است که عمدتاً از طریق رویان زایی بدنی (Somatic embryogenesis) بافت نوسل تخمدان مورد مطالعه قرار گرفته است. کشت بافت اندام های دیگررویشی مانند برگ، ساقه، دمبرگ و کشت نوک ساخساره کمتر موفقیت آمیز بوده و مشکل تر می باشند. در روش رویان زایی بدنی معمولاً تعدادی جنینی های غیر معمولی (abnormal) بعلت استفاده از هورمون 2,4-D بوجود می آید همچنین در روش رویان زایی بدنی و کشت نوسل تخمدان میوه نارس، محدودیت زمانی برای تهیه ریز نمونه اولیه خواهیم داشت اما در روش اندام زایی غیرجنسی ضمن آنکه گیاهک های نرمال تولید می شوند، برگ دهی درختان جهت تهیه ریز نمونه در طیف زمانی وسیعتری در طول سال رخ می دهد. از مشکلات موثر درکشت بافت انبه ضدعفونی نمونه ها و ترشح مواد قهوه ایی (فنولی) می باشد (توماس و راویندرا ۱۹۹۷). درگزارش راگوانشی و سریواستاوا (۱۹۹۵) برای رفع مشکل تولید مواد قهوه ایی (فنولی) پس از ضد عفونی سطحی برگها آنها را در محیط کشت مایع روی شیکر قرارداده و سپس روی محیط کشت جامد کشت نمودند و نتیجه گرفتندکه این روش در حذف اثرات نامطلوب مواد فنولی و نتیجتاً اندام زایی و درصد زنده مانی بعدی موثر بوده است. چاندرا و همکاران (۲۰۰٤) برای رفع مشکل فوق در کشت جوانه های جانبی انبه آنها را هر روز تا یک هفته در محیط کشت جدید جابجا کرده و سپس این جابجایی را هر هفته یکبار ادامه دادند و گزارش کردند این روش حدود ۸۰٪ موفقیت آمیز بوده است. دراین تحقیق سعی برآن بود تا با استفاده از اندام رویشی برگ درخت بالغ در مرحله نخست اقدام به ضد عفونی سطحی وسپس کالزایی انجام شود.

مواد و روش‌ها:

نمونه گیری از برگهای درخت انبه مشک با شماره پلاک ۱۱ واقع در روستای تنبانو شهرستان میناب انجام شد. پس از قطع شاخه انتهایی حاوی برگ های جدید نوظهور حذف برگهای صدمه خورده و زخمی و یا برگهایی که اثرات نیش حشرات برروی آنها مشهود بود، در زیر شیرآب جاری شستشوی مقدماتی بمدت ۱-۲ ساعت انجام شد. تیمارهای ضدعفونی برگها A:هیپوکلریت سدیم ۱٪ بازمان ۷ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۰۵٪ با زمان ٦ دقیقه B: کلرید جیوه ۰/۰۵٪ بازمان ٦ دقیقهC: الکل اتیلیک ۵۰٪ بازمان ۱۵ ثانیه و کلرید جیوه ۰/۰۵٪ بازمان۱۰ دقیقه D: کلرید جیوه ۰/۰۵٪ بازمان۱۰ دقیقه بود. به هر محلول (غیر از الکل اتیلیک)، ۱ قطره توین۲۰ به ازای هر۱۰۰ سی سی محلول اضافه میشد. تعداد تکرار ها برای هر تیمار ۲۰ شیشه در نظر گرفته شده و در نهایت نمونه ها با آب مقطر استریل سه بار آبکشی شدند. برای کالزایی، برگها به قطعات ۱-۳ سانتیمتری که هر قطعه حاوی یک رگبرگ اصلی بود تقسیم شده و روی محیط کشت MS تغییر یافته کشت ودرتاریکی قرار داده شدند(شکل۲). برای حذف اثرات نامطلوب مواد فنولی، نمونه ها هر سه روز یکبار به محیط کشت جدید منتقل می شدند. محیط کشت MS تغییر یافته شامل نصف مقدار ماکروالمنت های MS ، میکروالمنت ها و مواد آلی محیط MS بطور کامل با تیامین ۰/٤ میلی گرم در لیتر ، گلوتامین ٤۰۰ میلی گرم در لیتر، ساکارز ۵۰ گرم در لیتر و فیتاژل ۲ گرم در لیتر بود. تیمارهای هورمونی مطابق جدول ۱ و تعداد تکرارها ۲۰ برای هر تیمار هورمونی در نظر گرفته شد. بعد از یکماه آمارگیری از میزان کالوس دهی برحسب درصد انجام شد.

شکل۱- کالزایی در کناره های برگ و رگبرگ انبه



شکل۲- اثرات سوختگی و ترشح مواد فنولی در ریز نمونه های برگ انبه

جدول۱- مقایسه بین میانگین تیمارهای کالزایی در برگ انبه مشک

درصد کالزایی در برگها *	غلظت تیمارهای هورمونی (میلی گرم در لیتر)		
	TDZ	NAA	BA
٦/۲۵^{c}	۰	۰	۰
۳۹^{b}	۰/۰۵	۰/۰۵	۰
٤۱/۲۵^{b}	۰/۵	۰	۰
٤٤/۲۵^{b}	۰	۱	۰/۱
٤۵/۷۹^{b}	۰	۰/۱	۲
٤۸/۵^{ab}	۰	۰	٤
٤۹/۵^{ab}	۰	۰/۰۱	۰/۱
٦۹/۰۵^{a}	۰	۱	۱

* میانگین هایی که دارای حروف یکسان می باشند در سطح ۵٪ آزمون توکی تفاوت معنی دار با هم ندارند.

نتایج و بحث:

در آزمایش ضد عفونی سطحی برگها، الکل اتیلیک ۵۰٪ و هیپوکلریت سدیم ۱٪ اثرات سوختگی شدیدتری نسبت به کلرید جیوه ۰/۰۵٪ نشان می دادند. با توجه به اینکه درصد سوختگی برگها بر روی کالزایی برگها موثر می باشد لذا تیماری که کمترین اثرات سوختگی و آلودگی را نشان می داد، تیمار D برای ضدعفونی سطحی در نظر گرفته شد. جابجایی سه روز یکبارنمونه ها در کاهش ترشح مواد فنولی موثر بود. در کالزایی برگها تفاوت آشکار و معنی دار درصد کالزایی شاهد با بقیه تیمارها نشان دهنده آن است که وجود هورمون برای کالزایی ضروری بوده و در شرایط بدون هورمون، کالزایی درمراحل اولیه متوقف می شود. ضروری بودن وجود هورمون جهت کالزایی از لپه های انبه را رائو و همکاران (۱۹۸۲) نیز گزارش کرده اند. کالوسها بیشتر در محل قطع رگبرگها مشاهده می شدند(شکل۱). اثرات کالزایی ترکیب هورمونی NAA و BA از بقیهٔ تیمارها موثرتر بوده و افزایش غلظت آنها تا ۱ میلی گرم در لیتر بالاترین درصد کالزایی را نشان می دهد که با شاهد و تیمارهای TDZ تفاوت معنی دار دارد. حالت ترکیبی دو هورمون BA و NAA نیز در گزارش گوانشی و اسریواستاوا (۱۹۹۵) در ایجاد کالوسهای اندام زای برگهای رقم آمراپالی موثر بوده اند. بنظر می رسد هورمون NAA در تحریک به تولید کالوس و هورمون BA در ادامه رشد و درصد زنده مانی کالوسها نقش داشته باشند.

منابع:

1- Chandra, R.; Padariq, T.C.; Sruvastava; S. (2004), Factors influencing in vitro establishment of mango shoot buds. Indian Jo. of plant physio. 9 (2) - P. 136-144.
2- Thomas, P.; Ravindrag M.B. (1997), shoot tip culture in Mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season. - J. Hort. sci. 72(5) 713-722.
3- Raghuvanshi, S.S. and Srivastava, A. (1995), Plant regeneration of mangifera indica using liquied shaker culture. plant cell tissue and organ culture. 41, 83-852.
4- Rao, A.N., Sin, Y.M., Kathagoda, N. and Hutchinson, J.F. (1982). Cotyledon tissue culture of some tropical fruits. P.124-137. In: A.N.Rao (ed.), Tissue Culture of Economically Important Plants. COSTED, Singapore.

Study on disinfection and callus initiation of mango leaves Mashk local variety in vitro.

Abstract:
For callus initiation to produce asexual propagation, young leaves of mango tree Mashk local variety were sterilized and cultured on modified MS media containing NAA, BA and TDZ hormones. Cultures were kept in dark conditions. To avoid undesirable phenolic exudation effects, all samples were transferred to the same related fresh media within each three days intervals to remove phenolic exudation. Leaves were evaluated of callus initiation, infection and necrosis of sterilizer materials. Hormonal compounds were include BA, TDZ and NAA and sterilizer solutions were sodium hypochlorite 1%, ethanol 50% and $HgCl_2$ 0.05% with different times. Results showed that among treatments, $HgCl_2$ 0.05% with 10 minutes had minimum impact necrosis and the lowest infection rate. Between hormonal treatments combination of NAA and BA (1mg/l) was the best callus initation.