دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر القای کالوس و باززایی برخی پایه‌های مرکبات

سیده زهرا حسینی[۱]، نادعلی بابائیان جلودار[۲]، حشمت اله رحیمیان[۲] و غلامعلی رنجبر[۲]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مس‌ول: zahra.hosseini96@yahoo.com)
۲ و ۳- استاد و دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۹/۳

چکیده

به منظور بررسی تاثیر تنظیم‌کننده‌های رشد بر القای کالوس‌زایی و باززایی پایه‌های مختلف مرکبات، پنج پایه مرکبات انتخاب شد. بعد از استریل بذرها به محیط کشت و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داده شد و بعد از گذشت یک ماه ریز نمونه‌هایی از برگ‌های جوان تهیه شدند. القای کالوس روی محیط کشت EME تحت آزمایش فاکتوریل با سه عامل رقم در پنج سطح (نارنج، پونسیروس، سیترنج، سیترومله، ولکامریانا)، غلظت هورمون NAA در سه سطح (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت هورمون Kin در سه سطح (۳، ٤، ٦ میلی گرم در لیتر) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در مرحله باززایی کالوس، ۵ پایه مرکبات با ۵ ترکیب هورمونی تحت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج، بیشترین درصد کالوس‌زایی رقم نارنج مربوط به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA+سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۲۵ درصد)، بیشترین درصد کالوس‌زایی رقم پونسیروس مربوط به یک میلی‌گرم در لیتر NAA+سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۱۰۰ درصد) و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۱۰۰ درصد) بوده است. در مورد رقم سیترنج بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + شش میلی‌گرم در لیتر Kin (۹۱ درصد) و سیترومله مربوط به یک میلی‌گرم در لیتر NAA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۹۲ درصد) و در رقم ولکامریانا بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۱۰۰ درصد) بوده است. فراوانی کالوس‌زایی غالبا متاثر از تنظیم‌کننده‌های رشدی NAA و Kin با غلظت‌های ۱.۵ و سه میلی‌گرم در لیتر بود. همچنین BA و NAA در باززایی موثر شناخته شده اند. به نحوی با افزودن سه میلی‌گرم در لیتر Kin به محیط کشت، کالوس‌دهی و ۰/۲ میلی‌گرم BA و یک میلی‌گرم NAA باززایی از کالوس افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: بنزیل آمینوپورین، پایه، کاینتین، کشت بافت، مرکبات، نفتالن استیک اسید

مقدمه

مرکبات جزء مهمترین محصولات کشاورزی بوده و براساس گزارشات فائو در سال ۲۰۱۳، به طور وسیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و در بیش از ۹۰ کشور جهان کشت می شوند. در این ارتباط ایران یازدهمین کشور تولید کننده مرکبات در جهان است (۶). جنس مرکبات دارای گونه‌های زیادی می‌باشند. از تکنیک کشت بافت در برنامه‌های به‌نژادی مرکبات استفاده می‌شود (۴). از میان تنظیم‌کننده‌های رشد اکسین‌ها به عنوان محرک کالوس‌زایی و سیتوکنین‌ها به عنوان تشدید کننده تقسیم سلولی و تکثیر شناخته می‌شوند (۱۰). ساتیوا و همکاران (۱۹) در بررسی تاثیر انواع ریز نمونه‌ها و هورمون‌های مختلف رشد روی کالوس‌زایی و باززایی در رافلمون (*Citrus jambhiri* Lush.) به این نتیجه دست یافتند که حدود ۵۷ درصد باززایی با ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BA انجام گرفت. ساتیوا و همکاران (۱۸) در بررسی اثر هورمون‌ها و روش‌های باززایی کالوس (*Citrus jambhiri* Lush.) به این نتیجه دست یافتند که حداکثر کالوس‌زایی (۹۱/۶۶ درصد) در محیط MS با دو میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره مالت انجام گرفت. حداکثر باززایی و ریشه‌زایی (۹۱/۶۷ درصد) در محیط MS ½ با ۰/۵ میلی‌گرم NAA انجام گرفت. رمدان و همکاران (۱۴) در بررسی تحت عنوان نقش تنظیم‌کننده‌های رشد در کالوس‌زایی از جنین در پنج پایه مرکبات به این نتیجه دست یافتند که هورمون‌ها تاثیر معنی‌داری روی کالوس‌زایی نشان دادند. بیشترین فراوانی کالوس‌ها ۱۰۰ درصد و ۸۳ درصد در دو ترکیب یک میلی‌گرم در لیتر 2,4,D و دو میلی‌گرم در لیتر 2,4,D با یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد. عظیم و همکاران (۲) در بررسی توسعه‌ی کشت بافت و کالوس‌زایی در مرکبات به این نتیجه دست یافتند که بیشترین کالوس‌زایی (۶۸ درصد) از مریستم انتهایی شاخه با دو میلی‌گرم در لیتر 2,4,D و بیشترین شاخه‌زایی (۷۰ درصد) در محیط MS با یک میلی‌گرم در لیتر BA مشاهده شد. سینق و همکاران (۲۰) در بررسی تحت عنوان تکثیر ارقام مرکبات در شرایط درون‌شیشه‌ای بیان نمودند که وقتی نمونه‌ها در محیط MS به همراه یک میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند ریشه‌زایی در سطح بالایی صورت گرفت. گیاهچه‌ها با موفقیت به خاک منتقل شدند. احمدی حصار و همکاران (۱) در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون Kin روی باززایی مرکبات به این نتیجه دست یافتند که ریشه‌زایی در غلظت‌های ۰/۵ تا دو میلی‌گرم در لیتر Kin و محیط MS مشاهده شد. بهترین طول شاخه (۱۱/۷۳ میلی‌متر) و بیشترین تعداد گره (۴/۶۴) وقتی مشاهده شد که دو میلی‌گرم در لیتر Kin استفاده کردند. بیشترین طول ریشه (۵۴ میلی‌متر) در استفاده از یک میلی‌گرم در لیتر Kin حاصل شد. تحلیل داده‌های آنها نشان داد که Kin روی طول شاخه، ریشه، تعداد گره و تعداد ریشه تاثیر معنی‌داری داشت. گسوامی و همکاران (۱۱) در بررسی

ریزازدیادی بذور لیمو (*C. limon* L.) و بررسی کیفیت ژنتیکی ریزنمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD بیان نمودند که بیشترین باززایی ساقه در Kin (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. فتاح و همکاران (۷) در بررسی نقش هورمون‌های گیاهی BAP و NAA در باززایی و اندام‌زایی مرکبات در شرایط in vitro به این نتیجه دست یافتند که بهترین ترکیب هورمونی برای باززایی و اندام‌زایی ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA است. ابراهیم و همکاران (۱۲) در بررسی باززایی مستقیم و غیر مستقیم پوملو محلی (*C. grandis*) به این نتیجه دست یافتند که جنین‌های نوسلار در محیط MS کشت شده با دو یا چهار میلی‌گرم در لیتر BA به همراه ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA بعد از هشت هفته شاخه‌زایی مستقیم داشتند. ساینی و همکاران (۱۶) در بررسی اندام‌زایی و باززایی مستقیم در رافلمون به این نتیجه دست یافتند که بالاترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS به همراه BA (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر)+ GA3 (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. همچنین با بالاترین درصد ریشه‌زایی (۷۷٪) مربوط به محیط MS شامل NAA (۱ میلی‌گرم در لیتر)+IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. فراتنال و همکاران (۹) در بررسی باززایی از کالوس *Citrus* × *monstruosa* به این نتیجه دست یافتند که بهترین تیمار برای باززایی ۳۵ میکرومولار BA با ۵/۵ میکرومولار NAA بوده است. همچنین بهترین باززایی در میانگره ساقه ایجاد شده است. بهترین ریشه‌زایی از ریزنمونه‌ها در MS ½ با ۵/۴ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار IBA ایجاد شده است. راستگو و همکاران (۱۵) در بررسی باززایی پوملو بیان نمودند که بهترین کالوس‌زایی در محیط شامل پنج میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (۱۰۰٪) بوده است. همچنین باززایی شاخه‌ها در محیط MS ½ با چهار میلی‌گرم IBA ایجاد شد. بالچ و آلجو (۳) در باززایی ماندارین (*C. reticulata*) و لایم مکزیکی (*C. aurantifolia*) از طریق اندام‌زایی مستقیم، بهترین باززایی لایم مکزیکی (۹۶٪) و ماندارین (۸۸٪) در شرایط ۳۳/۳ میکرومولار BA و ۵/۴ میکرومولار NAA گزارش کردند. فیلهو و همکاران (۸) در باززایی ساقه از ریز نمونه‌های اپی‌کوتیل پرتقال (*Citrus sinenis* L.) به این نتیجه دست یافتند که بهترین شاخه‌زایی در ۲ الی پنج میکرومولار BA ایجاد شده است. بیشترین تعداد شاخه‌های طویل در محیط کشت به همراه ۰/۵ میکرومولار BA مشاهده شد. عثمان و همکاران (۲۱) در بررسی شاخه‌زایی از نمونه گره ساقه از ارقام مرکبات به این نتیجه دست یافتند که شاخه‌زایی و ریشه‌زایی با افزایش مطرح BA و NAA در محیط MS انجام شد. همچنین بیشترین ریشه‌زایی در رقم کینو با ۱۰ میلی‌گرم در لیتر NAA مشاهده شد. در مطالعات قبلی روی گیاه مرکبات، پایه‌های مختلف از نظر درصد کالوس‌زایی و باززایی با یکدیگر مقایسه نشده اند. هدف از این مطالعه، دستیابی به گیاهچه کامل در کوتاه‌ترین زمان و انتخاب بهترین محیط کشت همراه با ترکیبات هورمونی برای هر پایه مرکبات است.

مواد و روش‌ها

الف) جوانه‌زنی بذر

بذرهای پایه های مختلف مرکبات از شرکت باغداری مرکبات فجر ساری تهیه شد که برای استریل کردن بذرها در زیر هود، ابتدا بذرها با آب جاری شستشو داده شدند، بعد در الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه تکان داده شدند و سپس به وسیله‌ی آب مقطر استریل شستشو و در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه همراه با تکان دادن قرار داده و بعد سه تا پنج بار با آب مقطر دو بار استریل شده کاملا شستشو شدند (۱۳). برای جوانه‌زنی و تولید گیاهچه به منظور دستیابی به ریزنمونه، بذرها در محیط کشت EME (جدول ۱) بدون هورمون تحت شرایط استریل کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از یک هفته بذور جوانه زده و پس از گذشته شش هفته از زمان کشت بذر گیاهچه‌های تازه جوانه زده آماده برای تهیه ریزنمونه برگی از برگ‌های جوان بودند (۱۹).

ب) کالوس زایی

در مرحله اول محیط کشت EME حاوی هورمون های NAA در سه سطح (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و Kin در سه سطح (۳، ۴، ۶ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. پس از تنظیم pH به میزان ۵/۸–۵/۶ مقدار هشت گرم آگار در لیتر به محیط کشت اضافه و استریل شد. بعد محیط کشت در پتری دیش‌های استریل به میزان مشخص (۲۵–۲۰ میلی متر) توزیع شد. برای تهیه ریزنمونه از گیاهچه‌های درون شیشه‌ای، برگ به قطعات یک سانتیمتر مربعی برش داده شدند. ریزنمونه‌ها بلافاصله به محیط کشت منتقل شده و دور پتری دیش‌ها با پارافیلم بسته شد. سپس پتری‌ها در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. بررسی کالوس‌زایی از ریزنمونه‌های برگی با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. فاکتوریل با سه عامل رقم (نارنج، پونسیروس، سیترنج، سیترومولو، ولکامریانا)، هورمون NAA (۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و هورمون Kin (۳، ۴، ۶ میلی‌گرم در لیتر) به اجرا درآمد. در هر پتری چهار ریزنمونه قرار داده و هر پتری به منزله یک تکرار قلمداد شد. در نهایت [(پنج (رقم مرکبات)× سه سطح NAA × سه سطح Kin × سه (تکرار)] تهیه شد و ۱۳۵ پتری دیش مورد مطالعه قرار گرفت. درصد کالوس‌زایی در فاز کالوس‌زایی از نظر ترکیبات هورمونی و پایه‌های مرکبات مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

ج) باززایی

جهت باززایی غیر مستقیم، کالوس‌های حاصل از هر چهار ریزنمونه موجود در پتری دیش از پنج پایه مختلف مرکبات (نارنج، پونسیروس، سیترنج، سیترومولو، ولکامریانا) به محیط کشت منتقل شد و از تیمارهایی به شرح جدول ۲ استفاده شد. بعد پتری دیش‌ها در شرایط نوری هشت ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از رشد، به شیشه‌های مربا منتقل شدند.

جدول ۱- ترکیبات عناصر مورد استفاده برای تهیه یک لیتر محیط کشت EME
Table 1. Elements used to produce one liter of culture medium EME

ترکیبات شیمیایی	mg/l
NH4N03	1,650
KNO3	1,900
KH2PO4	170
MgSO4 7H20	370
CaCl2 2H20	440
Na2 EDTA	37.3
FeSO4 7H2O (EDTA)	27.8
MnSO4 H2O	22.3
ZnSO4 7H2O	8.6
H3BO3	6.2
KI	0.83
Na2 MoO4 2H20	0.25
CuSO4 5H2O	0.025
CoCl2 6H2O	0.025
Thiamine HCI	10
Pyridoxine HCI	10
Nicotinic acid	1
Myo-inositol	100
Malt extract	500
Sucrose	50
Agar	8,000

جدول ۲- ترکیبات هورمونی استفاده شده برای باززایی از کالوس
Table 2. Culture media from regeneration of callus

تیمارهای هورمونی	
0.5 mg/l BA+ 0.5 mg/l Kin+ 0.1 mg/l NAA	T1
0.5 mg/l BA+ 0.5 mg/l Kin+ 1 mg/l NAA	T2
0.2 mg/l BA+ 1 mg/l NAA	T3
3 mg/l Kin+ 1.5 mg/l NAA	T4
0.5 mg/l BA+ 3 mg/l Kin+1.5 mg/l NAA	T5

د) تجزیه آماری

صفات درصد کالوس‌زایی و باززایی مورد محاسبه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و MSTATC انجام گرفت و برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج و بحث

الف) کالوس زایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که میزان کالوس‌زایی تحت تاثیر ارقام (نارنج، سیرنج، سیترومللو، پونسیروس، ولکامریانا) قرار گرفتند. همچنین مقادیر مختلف هورمون‌های NAA و Kin تاثیر معنی‌داری روی میزان کالوس‌زایی نشان داد. در مورد برهمکنش ارقام و هومون‌ها می‌توان بیان نمود که اثر متقابل رقم× هورمون NAA و Kin و همینطور اثر متقابل هورمون Kin × هورمون NAA تاثیر معنی‌داری روی میزان کالوس‌زایی داشت. قابل ذکر است که اثر متقابل سه گانه رقم× هورمون NAA × هورمون Kin در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بوده است (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین مربعات و درجه آزادی منابع تغییر برای درصد کالوس‌زایی
Table 3. Results of Analysis of variance (ANOVA) and average of means of different factor on callus induction

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد کالوس زایی
ارقام مرکبات	۴	۲۶۴۴.۶۴**
هورمون NAA	۲	۲۸۱۲.۰۶**
هورمونKin	۲	۲۹۷۴.۱۲**
رقم×NAA	۸	۱۲۳۰.۴۶**
رقم×Kin	۸	۲۸۸۴.۱۱**
NAA× Kin	۴	۱۱۰۰.۰۸**
رقم×NAA× Kin	۱۶	۱۲۵۴.۸۳**
خطا	۹۰	۲۶۴.۱۳
کل	۱۳۴	–
ضریب تغییرات	–	۱۷.۶۴

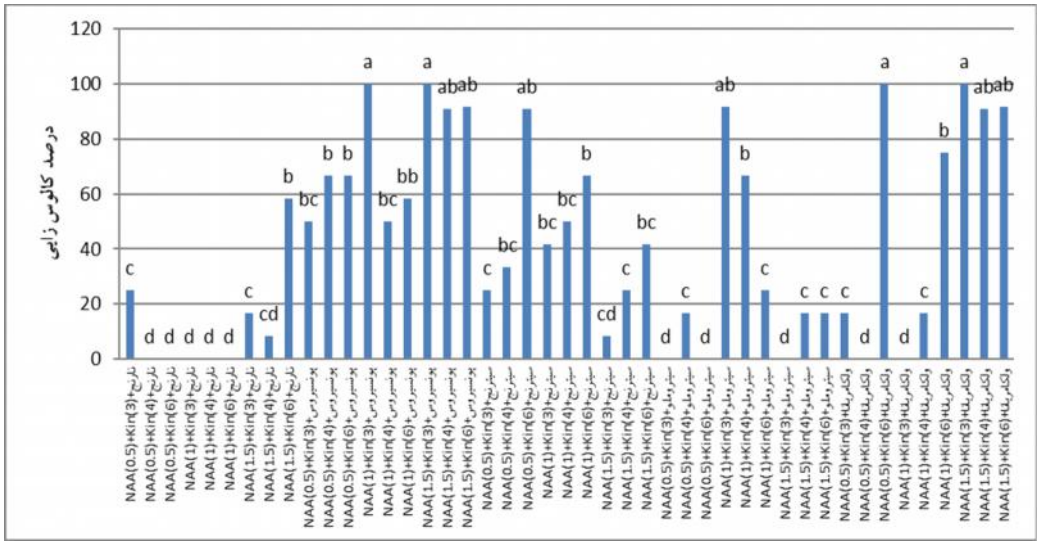
**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

اثر متقابل رقم× هورمون NAA × هورمون Kin نشان می‌دهد که بیشترین درصد کالوس‌زایی در پونسیروس با ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و سه میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin (۱۰۰ درصد)، پونسیروس با ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و شش میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin (۱۰۰ درصد)، ولکامریانا با ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و شش میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin (۱۰۰ درصد)، ولکامریانا با ترکیب هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA و سه میلی‌گرم در لیتر هورمون Kin (۱۰۰ درصد) بوده است (شکل ۱). ساتیوا و همکاران (۱۹) در بررسی اثر هورمون‌ها و روش‌های مختلف باززایی از کالوس (*C. jambhiri* Lush) به این نتیجه دست یافتند که حداکثر کالوس‌زایی (۹۱/۶۶ درصد) در محیط MS با دو میلی‌گرم در لیتر NAA به همراه ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره مالت انجام گرفت. نتیجه این بررسی نیز با نتایج ساتیوا و همکاران (۱۹) مطابقت دارد. این مطلب بیانگر نقش هورمون NAA در افزایش درصد کالوس‌زایی ارقام مرکبات است.

براساس نتایج بدست آمده از این بررسی، بیشترین درصد کالوس‌زایی رقم نارنج مربوط به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۲۵ درصد)، بیشترین درصد کالوس‌زایی رقم پونسیروس مربوط به یک میلی‌گرم در لیتر NAA+ سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۱۰۰ درصد) و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA+ سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۱۰۰ درصد) می‌باشد. در مورد رقم سیترنج بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + شش میلی‌گرم در لیتر Kin (۹۱ درصد) و سیترومولو مربوط به یک میلی‌گرم در لیتر NAA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۹۲ درصد) و در رقم ولکامریانا بیشترین درصد کالوس‌زایی مربوط به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin (۱۰۰ درصد) بوده است.

احمدی حصار و همکاران (۱) در بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف هورمون Kin روی باززایی به این نتیجه دست یافتند که ریشه‌زایی در غلظتهای ۰/۵ تا دو میلی‌گرم در لیتر Kin در محیط MS مشاهده شد. بهترین طول شاخه (۱۱/۷۳میلیمتر) و بیشترین تعداد گره (۴/۶۴) وقتی مشاهده شد که دو میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. تحلیل داده‌های آنها نشان داد که Kin روی طول شاخه، ریشه، تعداد گره و تعداد ریشه تاثیر معنی‌داری داشت. نتیجه این بررسی نیز با نتایج احمدی حصار و همکاران (۱) مطابقت دارد. این مطلب بیانگر نقش هورمون Kin در افزایش درصد کالوس‌زایی ارقام مرکبات است.

چتزیسویدیس و همکاران (۵) در بررسی تاثیر NAA و ویتامین B2 روی ریشه‌زایی مرکبات در کشت درون‌شیشه‌ای بیان نمودند که تیمارهای یک میلی‌گرم در لیتر NAA افزایش طول ریشه را نشان داد. ریشه‌زایی در پونسیروس تحت تاثیر ریبوفلاوین قرار نگرفت. اما این افزایش طول ریشه با اضافه نمودن NAA به محیط کشت در رقم پونسیروس مشاهده شد. نتایج این بررسی نیز مؤید این مطلب است که افزایش غلظت هورمون NAA موجب افزایش درصد کالوس‌زایی در رقم پونسیروس شده است و با نتایج چتزیسویدیس و همکاران (۵) مطابقت دارد.



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین درصد کالوس‌زایی ارقام مختلف مرکبات در سطوح مختلف غلظت هورمون‌های Kin و NAA
(ستون‌های دارای حروف مشترک در هر ستون براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.)
Figure 1. Callus induction from leaf explant of different genotypes of citrus in MS medium supplemented with different levels of kin and NAA

ب) باززایی از کالوس

براساس نتایج تجزیه واریانس درصد باززایی از کالوس، ارقام مرکبات، تیمار هورمونی و اثر متقابل رقم × تیمار هورمونی اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ از خود نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین مربعات و درجه آزادی منابع تغییر برای درصد باززایی

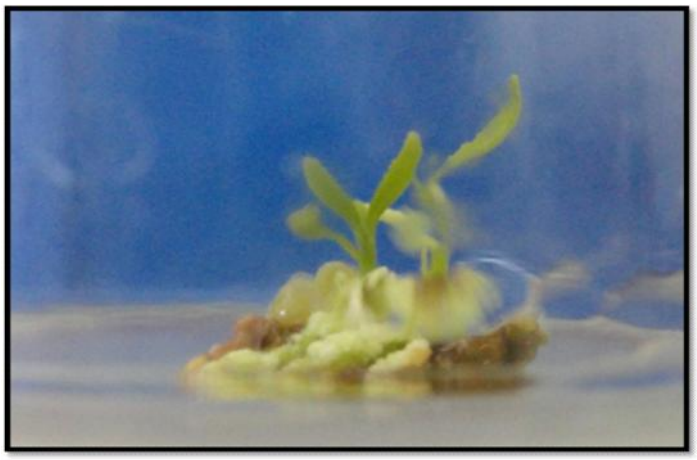
Table 4. Results of Analysis of variance (ANOVA) and average of means of different factor on regeneration

منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد باززایی
ارقام مرکبات	۴	۲۸۵۸.۸۳**
تیمار هورمونی	۴	۷۱۲/۱۶*
رقم×تیمار هورمونی	۱۶	۶۸۵۶/۹۵**
خطا	۵۰	۵۰۹/۳۳
کل	۷۴	–
ضریب تغییرات	–	۱۸.۸۰

* و ** : به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

شکل ۲- اندام‌زایی کالوس حاصل از ریز نمونه‌های برگی رقم پونسیروس در محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی T2

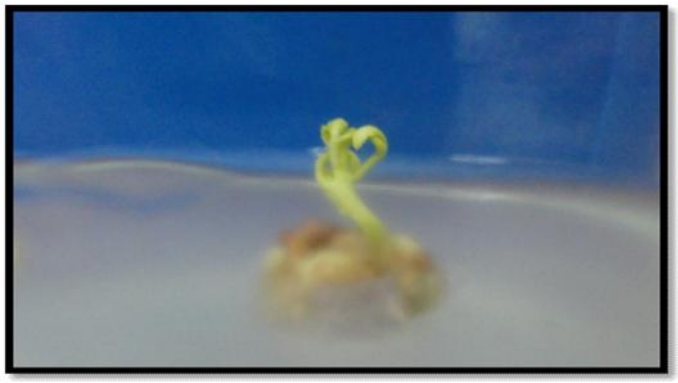
Figure 2. Samples of the trifoliate leaf callus organogenesis in medium containing T2



شکل ۳- اندام‌زایی کالوس حاصل از ریز نمونه‌های برگی رقم نارنج در محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی T4

Figure 3. Samples of Sour orange leaf callus organogenesis in medium containing T4

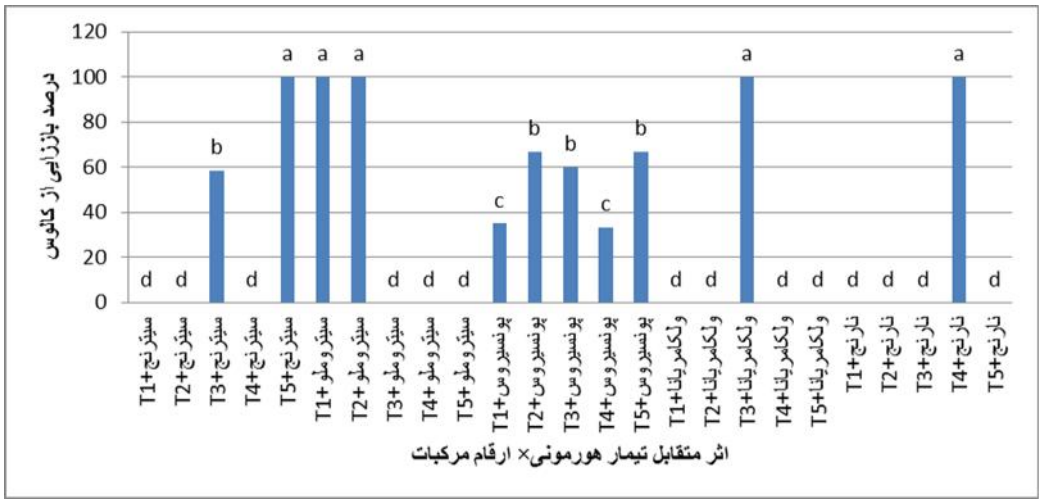
شکل ۴- اندام‌زایی کالوس حاصل از ریز نمونه‌های برگی رقم سیترنج در محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی T5
Figure 4. Samples of Sour orange leaf callus organogenesis in medium containing T5



شکل ۵- اندام‌زایی کالوس حاصل از ریز نمونه‌های برگی رقم سیترومیلو در محیط کشت حاوی ترکیبات هورمونی T5
Figure 5. Samples of Sour orange leaf callus organogenesis in medium containing T5

نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل رقم×تیمارهای هورمونی حاکی از این است که بیشترین درصد باززایی از کالوس معادل ۱۰۰٪ مربوط به رقم سیترنج با تیمار هورمونی T5 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) (شکل ۴)، رقم سیترومیلو با تیمارهای هورمونی T1 (۰/۵ میلی گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) و T2(۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + یک میلی‌گرم در لیتر NAA) (شکل ۵)، رقم ولکامریانا با تیمارهورمونی T3 (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA + یک میلی‌گرم در لیتر NAA)، رقم نارنج با تیمار هورمونی T4 (سه میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA)(شکل ۳) بوده است (شکل ۶). نتایج حاصله بیان می‌کند که ارقام مختلف مرکبات نسبت به تیمارهای مختلف هورمونی عکس‌العمل‌ها و درصد باززایی‌های مختلفی را از خود نشان داده‌اند. در مطالعات صورت گرفته در زمینه باززایی از کالوس *Citrus* × *monstruosa* توسط فراتمال و همکاران (۹)، بهترین تیمار برای باززایی از میانگره ساقه ۳۵ میکرومولار BA با ۵/۵ میکرومولار NAA و بهترین ریشه‌زایی (۸۰/۳۴٪) از ریزنمونه‌ها در MS ½ با ۵/۴ میکرومولار NAA و ۲/۵ میکرومولار IBA ایجاد شده است. بر اساس مطالعه بالچ و آلجو (۳) در باززایی لایم مکزیکی و نارنگی از اندام‌زایی مستقیم، بهترین باززایی لایم مکزیکی (۹۶٪)و نارنگی (۸۸٪) در شرایط ۳۳/۳ میکرومولار BA و ۵/۴ میکرومولار NAA اتفاق افتاد. فیلهو و همکاران (۸) در باززایی ساقه از ریز نمونه‌های اپی‌کوتیل پرتقال به این نتیجه دست یافتند که بهترین شاخه‌زایی در دو الی پنج میکرومولار BA ایجاد شده است. بیشترین تعداد شاخه‌های طویل در محیط کشت به همراه ۰/۵ میکرومولار BA مشاهده شد. ساینی و همکاران (۱۶) در بررسی اندام‌زایی و باززایی مستقیم در رافلمون به این نتیجه دست یافتند که بالاترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت MS به همراه BA (۰/۵ میلی‌گرم

در لیتر)+ GA_3 (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بوده است. همچنین با بالاترین درصد ریشه‌زایی (۷۷٪) مربوط به محیط MS شامل NAA (یک میلی‌گرم در لیتر)+IBA (۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) بوده است.



شکل ۶- مقایسه ی میانگین درصد باززایی از کالوس اثر متقابل تیمار هورمونی× ارقام مرکبات
Figure 6. Callus induction percentage of five citrus rootstocks according the combinations hormonal

در مجموع، بیشترین درصد باززایی (۱۰۰ درصد) مربوط به رقم سیترنج با تیمار هورمونی T5 (۰/۵ میلی گرم در لیتر BA + سه میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA)، رقم سیترومل با تیمارهای هورمونی T1 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA) و T2 (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر Kin + یک میلی‌گرم در لیتر NAA)، رقم ولکامریانا با تیمارهورمونی T3 (۰/۲ میلی‌گرم در لیتر BA + یک میلی‌گرم در لیتر NAA)، رقم نارنج با تیمار هورمونی T4 (سه میلی‌گرم در لیتر Kin + ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) بوده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آزمایشگاه بیوتکنولوژی و خانم مهندس عابدین‌پور بخاطر همکاری و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر را دارم.

منابع

1. Ahmadi Hesar, A., B. Kaviani, A. Tarang and S. Bohlooli Zanjani. 2011. Effect of different concentrations of kinetin on regeneration of ten weeks (*Matthiola incana*). Plant Omics Journal, 4: 236-238.
2. Azim Fazle, M.M., H. Rahman Shamsul, U. Prodhan Saif, S. Nayem Zobayer and M. Ashrafuzzaman. 2011. Development of efficient callus initiation of malta (*Citrus sinensis*) through tissue culture. International Journal of Agricultural Research Innovation and Technology, 1: 64-68.
3. Balch, M. and N. Alejo. 1997. In Vitro Plant Regeneration of Mexican Lime and Mandarin by Direct Organogenesis. HortScience, 32: 931-934.
4. Benelli, C., M.A. Germana, T. Ganino, D. Beghe and A. Fabbri. 2010. Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of Citrus reticulata. Biologia Plantarum, 54: 224-230.
5. Chatzissavvidis, C.H., Ch. Antonopoulou, I. Papadakis, I. Therios and K. Dimassi. 2010. Effects of NAA and vitamin B2 on in vitro rooting of Citrus. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science, 60: 189-192.
6. FAO. 2013. Statistical year book. World food and agriculture. 307 pp.
7. Fattah, B., M. Sohani, A. Afshari and B. Goleyn. 2011. The role of plant hormones BAP and NAA on the Regeneration and Organogenesis citrus in vitro culture. 12 Congress of Genetics, Tehran, Iranian Genetics Association, 5 pp (In persion).
8. Filho, J.C.B., A.K. Kobayashi, L.F.P. Peirera, Z. Hissano and L.G.E. Vieira. 2001. In vitro adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 1: 27-34.
9. Fraternale, D., L. Giamperi,. B. Anahi and C. Pierpaolo. 2010. In vitro plant regeneration from callus of *Citrus* × *monstruosa* (Pompia) an endemic citrus of Sardinia. Natural Product Communications, 5: 927-930.
10. Gholami, A., A. Majd, V. Alavi and P. Fallahian. 2011. Somatic embryogenesis and plant regeneration of orange seed. Journal of Plant Science, 27: 56-63.

11. Goswami, K., R. Sharma , P.K. Singh and G. Singh. 2013. Micropropagation of seedless lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using RAPD markers. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19: 137-45.
12. Ibrahim, M.A. 2012. In vitro plant regeneration of local pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck.) via direct and indirect organogenesis. Genetics and Plant Physiology, 2: 187-191.
13. Jafari Mofidabaadi, I. and M. Miri. 2011. in vitro culture of embryos and Nucelar sexually mature in orange (*Citrus aurantium*), National Science and Technology Conference seed, Mashhad, Islamic Azad University of Mashhad, 4 pp (In Persion).
14. Ramdan, R., N. Handaji, H. Beyahia and M. Ibriz. 2014. Influence of growth regulators on callus induction from embryos of five citrus rootstocks. Journal of Applied Biosciences. 73: 5959-5965.
15. Rastgoo, S. 2011. In Vitro Regeneration of Citrus: A Case Study on Pummelo (*Citrus grandis* [L.] Osbeck). Lap Lambert Academic Publishing. 184 pp.
16. Saini, H.K. and M.S. Gill. 2010. Direct shoot organization and plant regeneration in rouph lemon. Indian Journal Biotechnol, 9:419-423.
17. Sarma, C., A. Borthakur, S. Singh, M.K. Modi and P. Sen. 2011. Efficient in vitro plant regeneration from cotyledonary explants of Citrus reticulata L. Blanco. Annals of Biological Research, 2: 341–348.
18. Savita, S.B., G.S. Virk and A.K. Nagpal. 2011. An efficient plant regeneration protocol from callus cultures of Citrus jambhiri Lush. Physiology and Molecular Biology of Plants, 17: 161-9.
19. Savita, V, G.S. Virk and N. Avinash. 2010. Effect of Explant Type and Different Plant growth Regulators on Callus Induction and Plantlet Regeneration in *Citrus jambhiri* Lush. International Journal of Food Science & Technology, 5: 97-106.
20. Singh, S., B.K. Ray, S. Bhattacharyya and P.C. Deka. 1994. In Vitro Propagation of Citrus reticulata Blanco and Citrus limon. Hortscience. 29: 214-216.
21. Usman, M., S. Muhammad and B. Fatima. 2005. In vitro multiple shoot induction from nodal explants of Citrus cultivars. Journal of Central European Agriculture, 6: 435-442.

The Effect of Growth Regulators on Callus Induction and Regeration in citrus Rootstock

Seyedeh Zahra Hosseini[1], Nadali Babaeian Jelodar[2], Heshmatallah Rahimian[2] and Gholamali Ranjbar[3]

1- PhD. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: zahra.hosseini96@yahoo.com)
2 and 3- Professor and Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: October 3, 2015 Accepted: November 24, 2015

Abstract

One of the main objectives of citrus rootstock breeding is plants free of disease. In order to evaluate the effect of growth regulators on callus induction and regeneration of citrus rootstock, five citrus rootstocks were selected. Seeds were germinated after one month. Culture were incubated at 25 ° C and exposed to 16 hours per day. Explants were cultured on EME medium. Callus induction under factorial experiment with five citrus rootstock (Sour orange , Citrange, Citromelo, Poncirus, Volkameriana), concentration of NAA in three levels (0.5, 1, 1.5 mg) and concentration of Kin in three levels (3, 4, 6 mg) in a completely randomized design with three replications. The callus regeneration, five citrus rootstock with five hormonal treatment of factorial experiment in a completely randomized design with three replications was used. The results showed that the highest percentage of callus induction Sour orange of 0.5 mg/l NAA + three mg/l Kin (25 %), the highest percentage of callus induction poncirus of one mg/l NAA + three mg/l Kin (100%) and 1.5 mg/l NAA + three mg/l Kin (100 %). highest percentage of callus induction for Citrange on the 0.5 mg/l NAA + six mg/l Kin (91%) and Citromelo of one mg/l NAA + three mg/l Kin (92%) and the highest percentage Volkameriana callus induction to 1.5 mg/l NAA + three mg/l Kin (100 %). Frequency of callus induction with NAA and Kin (growth regulators)at concentrations of 1.5 and three mg/l. BA and NAA are known to be effective in regeneration. three mg/l Kin and 0.2 mg/l BA + one mg/l NAA increased callus induction and regeneration, respectively.

Keywords: Benzylaminopurine, Citrus, Kinetin, Naphthaleneacetic acid, Rootstock, Tissue culture