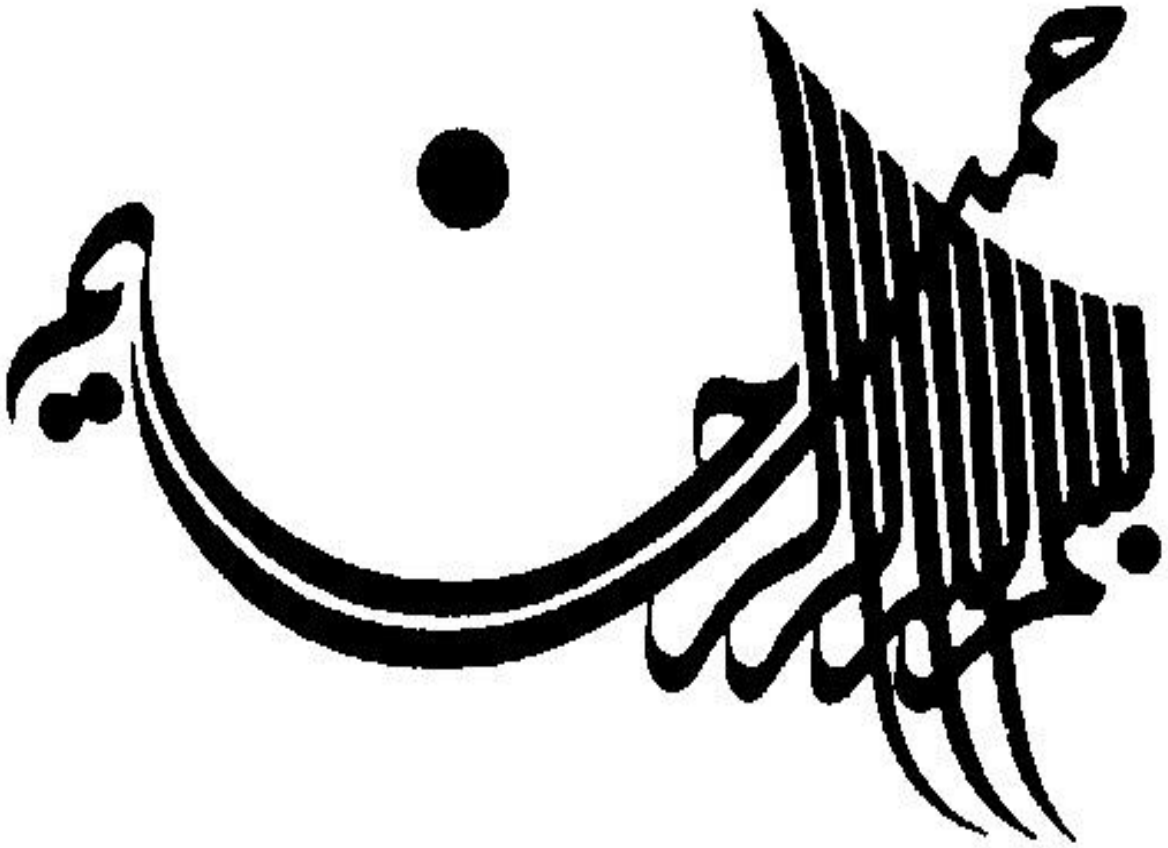

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه شاهرود

دانشکده مهندسی کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

تأثیر هورمون های گیاهی بر کشت درون شیشه ای لیموترش ایرانی

مرضیه خلیلی

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرّخی

دکتر امیر موسوی

بهمن ۱۳۹۱

ندانستن ها، کج فهمی ها و سردرگرمی امان به گواه باقرالعلوم (ع) ناشی از عدم شناخت امام زمان (عج) است

کاش آنقدر که تمنا و عطش دانشمندی داریم در پی بینش مندی نیز بودیم.

امید است با تقدیم این اثر به مولایمان، عنایات خدای متعال و مهدی موعود (عج) شامل حالمان گردد و راهی

در عرصه بینش مندی بیابیم به قول مولانا مرغ چون از زمین بالا پرد، اگر چه به آسمان نرسد این قدر باشد که از دام

دور باشد.

بی مزد بود و منّت هر خدمتی که کردم یارب مباد کس را مخدوم بی عنایت

تشکر ویژه

- حمد و سپاس خدای بزرگ و یگانه که توکل به ذات مقدسش و ذکر یادش مبین ان مع العسر یسرا و تطمئن القلوب است.
- مادر و پدر عزیزم که جانم بهای اندکی است برای قدردانی از زحماتشان.
- همسر صبور و نیکوخصال ام که طی هشت سال زندگی مشترک همواره یاری ام نمود.
- خانواده عزیزم به ویژه مژده، خواهر دوست داشتنی ام که در تدوین پایان نامه بسیار یاری ام نمود.

تشکر و قدردانی

- اساتید محترم آقایان دکتر فرّخی، دکتر موسوی، دکتر علوی و دکتر رضائی.
- کلیه ی اعضای محترم گروه شانکر باکتریایی مرکبات.
- کلیه ی اعضای محترم گروه دکتر موسوی.
- مهندس ابوالفضل مسعودی، مهندس مریم خوش نامی، مهندس اقدس رمضانی، دکتر فرانک هادی، دکتر فتانه یاری و دکتر مریم کریمی.
- و کلیه ی کارکنان محترم بخش بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه ملّی مهندسی ژنتیک به ویژه آقای وطن خواه، خانم گرشاسبی و خانم قاسمی

تعهد نامه

اینجانب مرضیه خلیلی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تاثیر هورمون‌های گیاهی بر کشت درون شیشه‌ای لیموترش (*Citrus aurantifolia*)تحت راهنمائی دکتر ناصر فرّخی و دکتر امیر موسوی متعهد می شوم .

تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .

- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ ۱۳۹۱/۱۲/۲۰

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

تحقیق فوق به سه بخش تقسیم شده است. باززائی غیر مستقیم لیمو خارکی و لایم (ژنوتیپ جهرم و هرمزگان) از ریزنمونه‌های گره و میان گره در محیط کشت پایه MS و MT حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، باززائی غیر مستقیم ریزنمونه اپی‌کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای در ۱۳ محیط کشت با تیمار هورمونی مختلف و باززائی مستقیم ریزنمونه اپی‌کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای در ۱۲ محیط کشت با تیمار هورمونی مختلف. متاسفانه اولین آزمایش به جهت آلودگی باکتریایی درونی ریزنمونه‌ها در مرحله‌ی کال‌زائی متوقف گردید. در دومین آزمایش تیمار هورمونی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین در ریزنمونه‌ها تولید کالوس نمودند. نتایج تجزیه واریانس اثر فاکتورهای ژنوتیپ، ریزنمونه و هورمون را بر درصد کال‌زائی معنی‌دار نشان داد. هم‌چنین دو نوع کالوس فشرده و پودری مشاهده شد.کالوس‌های تولید شده به دو تیمار نوری [روشنایی (شاخه‌زایی)، تاریکی (جنین‌زایی)] انتقال داده شدند. هشت هفته پس از کشت کالوس‌ها به محیط کشت جنین‌زائی و شاخه‌زائی هیچ‌گونه تغییری در کالوس‌ها مشاهده نگردید و تنها تعدادی از کالوس‌ها سبزرنگ شدند. در آزمایش سوم اثر معنی‌داری از هورمون و ریزنمونه بر شاخه‌زائی مشاهده شد.

کلمات کلیدی: لیموترش، کالوس، جنین‌زائی، باززائی

فهرست مطالب

۱-۱- مقدمه ۳

۱-۲-۱ گیاهشناسی و مرفولوژی مرکبات ۸

۱-۲-۲ لیموترش ۹

۱-۳ کشت بافت ۱۲

۱-۳-۱ ریزنمونه ۱۶

۱-۳-۲ ضدعفونی ریزنمونه‌ها ۱۷

۱-۳-۳ محیط کشت ۱۸

۱-۳-۴ تنظیم کننده‌های رشد در مرحله شاخه‌زائی ۱۸

۱-۳-۵ تنظیم کننده‌های رشد در مرحله ریشه‌زائی ۲۰

۲-۱-مواد ۲۶

۲-۱-۱ منبع گیاهی ۲۶

۲-۱-۲ مواد شیمیایی ۲۶

۲-۱-۳ تجهیزات ۲۸

۲-۱-۴ نرم افزارها ۲۸

۲-۲ روش‌ها ۲۸

۲-۲-۱ تهیه محلول پایه و آماده سازی محیط کشت ۲۸

۲-۲-۲ آماده سازی لامینار ایرفلو، ضدعفونی بذور و تهیه ریزنمونه ۳۱

۲-۲-۳ شرایط نگهداری کشت‌ها: ۳۶

۳-۱ آزمایش اول: بررسی اثر ژنوتیپ و محیط کشت بر درصد کال‌زائی کالوس‌های بدست آمده از ریزنمونه گره و میان گره ۴۲

۳-۲ آزمایش دوم: بررسی اثر هورمون، ریزنمونه و ژنوتیپ بر درصد کال‌زائی، اندازه کالوس و نوع بافت کالوس ۴۱

۳-۲-۱ بررسی اثر هورمون، ریزنمونه و ژنوتیپ بر درصد کال‌زائی ۴۴
۳-۲-۲ بررسی اثر ریزنمونه بر نوع بافت کالوس ۵۲
۳-۲-۳ بررسی اثر هورمون ، ریزنمونه و ژنوتیپ بر اندازه کالوس..... ۵۲
۳-۲-۴ انتقال کالوس‌ها به محیط کشت جنین‌زائی و شاخه‌زائی.....۶۱
۳-۳ آزمایش سوم: باززائی مستقیم لایم (ژنوتیپ جهرم).....۶۱
۳-۳-۱ بررسی اثر ریزنمونه و هورمون بر درصد باززائی لایم (ژنوتیپ جهرم) ۶۱
۳-۳-۲ بررسی اثر ریزنمونه و هورمون بر تعداد شاخه‌زائی لایم (ژنوتیپ جهرم) ۶۳
۳-۳-۲ بررسی اثر هورمونNAA بر درصد ریشه‌زائی وتعداد ریشه‌زائی لایم (ژنوتیپ جهرم) ۶۵
۳-۴ نتیجه‌گیری کلی ۶۹
۳-۵ پیشنهادات ۷۰
فهرست منابع ۷۲

فهرست اشکال

۱-۱ میوه‌ی لایم (الف) و لیسبون (لیمو خارکی) (ب)..... ۱۲
۱-۲ مراحل تشکیل جنین رویشی ۱۳
۱-۳ کالوس هایی با بافت فشرده ۱۵
۱-۴ انواع کالوس الف) کالوس آبکی ب) کالوس پودری ۱۵
۲-۱ نهال لایم و لیمو خارکی ۲۷
۲-۲ ریزنمونه‌های گره (الف) و میان‌گره (ب) در محیط کشت MT ۳۳
۲-۳ بذور کشت شده در محیط کشت MS (دو هفته پس از کشت) ۳۳
۲-۴ گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط تاریکی (یک هفته پس از جوانه زنی) ۳۴
۲-۵ قطعات ۱ سانتی‌متری اپی‌کوتیل در محیط کشت القا شاخه‌زائی ۳۴
۲-۶ ریزنمونه برگ لپه‌ای در محیط کشت القا شاخه‌زائی ۳۵
۲-۷ ریزنمونه برگ در محیط کشت القا شاخه‌زائی..... ۳۵

۳-۱ کال‌زائی در محیط کشت MS ریزنمونه گره (الف) و میان گره (ب). آلودگی باکتریایی ریزنمونه میان گره (ج). ۴۳

۳-۲ اثر محیط کشت بر درصد کال‌زایی ۴۶

۳-۳ اثر ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی ۴۶

۳-۴ اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی ۴۷

۳-۵ از بین رفتن ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر2,4-D (الف)، ریشه دهی ریزنمونه برگ در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (ب) کال‌زائی و ریشه دهی در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (ج). ۴۹

۳-۶ کال‌زائی ریزنمونه برگ لپه‌ای (الف) و اپی‌کوتیل (ب) در محیط کشت ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D ۵۰

۳-۷ اثر نوع ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۱

۳-۸ اثر ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی ۵۳

۳-۹ اثر هورمون بر درصد کال‌زایی ۵۳

۳-۱۰ اثر متقابل هورمون و نوع ریزنمونه بر درصد کال‌زایی ۵۴

۳-۱۱:کالوس فشرده (الف) و پودری (ب) ۵۴

۳-۱۲ رشد کالوس در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (الف) و ۱ میلی‌گرم در لیتر2,4-D با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین ۵۶

۳-۱۳ اثر هورمون بر اندازه کالوس ۵۷

۳-۱۴ اثر نوع ریزنمونه بر اندازه کالوس ۵۸

۳-۱۵ اثر ژنوتیپ بر اندازه کالوس ۵۸

۳-۱۶ کال‌زائی ریزنمونه برگ لپه‌ای (الف) و اپی‌کوتیل (ب) در محیط کشت ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین با ۱ میلی‌گرم در لیتر2,4-D ۵۹

۳-۱۷ سبز شدن کالوس ۴ هفته پس از انتقال به محیط کشت باززائی (الف) و ۸ هفته پس از انتقال (ب) ۶۲

۳-۱۸ شاخه‌زائی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل پنج هفته پس از کشت (الف)، برگ لپه‌ای (ب) و برگ (ج). شاخه‌زائی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل ۸ هفته پس از کشت (د)، برگ لپه‌ای (ض) و برگ (ه). انتقال شاخه‌های باززا به محیط کشت ریشه‌زائی ۹ هفته پس از کشت (ی)..... ۶۴
۳-۱۹ اثر هورمون بر درصد شاخه‌زایی ۶۵
۳-۲۰ اثر نوع ریزنمونه بر درصد شاخه‌زایی ۶۷
۳-۲۱ اثر نوع ریزنمونه بر تعداد شاخه‌زایی ۶۸
۳-۲۲ ریشه‌زائی شاخساره‌های باززا ۲ هفته پس از کشت (الف). رشد گیاهچه‌ها ۳ هفته پس از ریشه‌زائی..... ۶۸

.

فهرست جداول

۱-۱ غلظت مواد ضد عفونی کننده و زمان لازم جهت ضد عفونی اندام گیاهی..... ۱۹
۱-۲ خلاصه تحقیقات کشت بافت در مرکبات ۲۲
۲-۱ دستورالعمل ساخت یک لیتر محیط کشت MS و MT..... ۳۰
۳-۱ تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، محیط کشت و نوع ریز نمونه بر درصد کالوس‌زایی (میان گره)..... ۴۵
۳-۲ تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، هورمون و نوع ریزنمونه بر درصد کال‌زائی ۵۱
۳-۳ مقادیر کالوس های تولیدی در ریزنمونه های مختلف(٪) ۵۶
۳-۴ تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، محیط کشت و نوع ریزنمونه بر میزان رشد کالوس‌های تولید شده..... ۵۷
۳-۵ تجزیه واریانس اثر هورمون و نوع ریز نمونه بر درصد شاخه‌زائی..... ۶۵
۳-۶ تجزیه واریانس اثر هورمون و نوع ریز نمونه بر تعداد شاخه‌زایی ۶۷

فصل اول

مقدمه و کلیات

مرکبات در دسته‌ی گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری طبقه بندی می‌گردند.گونه‌های اقتصادی مرکبات عبارتند از: پرتقال، نارنگی، گریپ فروت، لیمو و لایم که علاوه بر مصرف تازه خوری در صنایع غذائی متعدد مانند تهیه‌ی آب میوه، کمپوت، اسانس، روغن مرکبات و شیره غلیظ شده مورد استفاده قرار می-گیرند.

مرکبات در نقاط گسترده‌ای از جهان کشت و کار می‌شوند و به همین دلیل تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی زیادی قرار دارند. در حال حاضر بیماری‌های زیادی مانند شانکر باکتریایی مرکبات، جاروک لیموترش و تریستیزا و غیره تولید تجاری این محصولات را در کشورمان با مشکل مواجه ساخته است (شرفی و همکاران ۱۳۹۰). در این فصل ناتوانی و توانمندی راهکارهای سنتی که برای رفع بعضی از مشکلات مرکبات به کار می‌رود بیان می‌گردد هم چنین نیازمندی اصلاح مرکبات به روش‌های نوین هم چون کشت بافت و .... بیان شده است.

از آنجائی که مبنای این تحقیق کشت بافت است روش‌های باززائی در مرکبات و لیموترش (باززائی مستقیم و غیر مستقیم)که تاکنون گزارش شده است ذکر گردیده است. در این فصل به بررسی گیاه-شناسی و کشت بافت مرکبات و لیموترش [(نوع محیط کشت، روش‌های ضدعفونی ریزنمونه، تنظیم کننده‌های رشد (القا شاخه‌زائی، ریشه‌زائی و کال‌زائی)] ذکر گردیده است.

۱-۱ مقدمه

مرکبات از زمره اولین میوه‌هایی بوده که انسان از دوره‌های ما قبل تاریخ و شروع کشاورزی در دنیا مورد کشت و کار قرار داده و از آن به عنوان محصول باغی و وحشی استفاده‌های زیادی کرده است. کنستانتره و آب میوه از محصولات فرآوری شده در مرکبات است. پکتین موجود در پوست مرکبات در صنایع غذایی برای تهیه ژله و مربا استفاده می‌شود همچنین مواد استحصالی مانند روغن‌ها و ترپن‌ها و فلاونوئیدهای گلیکوزیدی از آن‌ها بدست می‌آیند که در صنایع داروسازی و غذائی به کار برده می‌شوند (دیویس و آلبریگو، ۱۹۹۴). مرکبات از محصولات مهم باغبانی در سطح جهان است که از نظر تجارت جهانی (صادرات و واردات) در مقاوم دوم تولید میوه‌ها بعد از موز قرار دارند. علاوه بر مصرف تازه‌خوری و خشک میوه آن، در صنایع غذایی و داروئی نیز حائز اهمیّت هستند. گسترش مرکبات در جهان از ۴۰ درجه عرض شمالی تا ۴۰ درجه عرض جنوبی می‌باشد. بر اساس آمار فائو در سال ۲۰۰۸ سطح زیر کشت مرکبات در دنیا ۸/۷ میلیون هکتار بوده و میزان متوسط تولید محصول مرکبات جهان ۱۲۲ میلیون تن گزارش شده است. از این میان، در حدود هشتاد درصد مربوط به ۱۲ کشور عمده تولید کننده این محصول می‌باشد. تعداد کشورهای تولید کننده مرکبات ۱۷۰ کشور است که از لحاظ سطح زیر کشت به ترتیب کشورهای چین، برزیل، هند، نیجریه، مکزیک، مصر، اسپانیا، آمریکا، ایران، پاکستان، ایتالیا و آرژانتین مقام اول تا دوازدهم را دارا هستند. از نظر تولید نیز، کشور چین در صدر قرار گرفته است و کشورهای برزیل، آمریکا، مکزیک، هند، اسپانیا، ایران، ایتالیا، نیجریه و مصر به ترتیب مقام های بعدی را دارند (فائو ۲۰۰۸). بنا به گزارش سازمان خوار و بار جهانی، فائو (FAO) در سال ۲۰۰۸ میلادی تولید مرکبات در جهان ۱۰۵,۴۳۲,۵۷۸ تن در سال بوده است که سهم ایران در تولید جهانی در همین سال ۴ میلیون تن با متوسط عملکرد ۱۶/۹ تن در هکتار بوده است (آمارنامه جهاد کشاورزی ۸۷). سطح زیرکشت مرکبات کشور در سال ۱۳۸۷ حدود ۲۹۱ هزار هکتار برآورد شده است که ۸۲/۸ درصد آن

درختان بارور مرکبات و ۱۷/۲ درصد بقیه نهال می‌باشد. لیموترش ۳۲۲۰۱ هکتار از سطح اراضی کشت مرکبات را شامل می‌شود. تولید مرکبات کشور حدود ۴ میلیون تن در سال برآورد شده است. راندمان تولید مرکبات آبی درکشور ۱۶۹۳۱/۶ کیلوگرم در هکتار است و بیشترین تولید مرکبات با ۴۵/۱ درصد از کل تولید این محصول در استان مازندران بوده است. استان‌های فارس، منطقه جیرفت و کهنوج، هرمزگان، گیلان و کرمان به ترتیب با ۲۷/۵، ۹/۷، ۹/۴، ۲/۵ و ۲/۱ درصد بعد از مازندران در رتبه‌های بعدی تولید مرکبات در کشور قرار دارند. شش استان مزبور در مجموع ۹۶/۴ درصد مرکبات کشور را تولید کرده‌اند (آمارنامه جهاد کشاورزی ۱۳۸۷).

در تمام گونه‌ها و ارقام مرکبات، نهال‌ها ابتدا در خزانه و نهالستان تولید می‌شوند، سپس به زمین اصلی انتقال می‌یابند. ازدیاد درختان مرکبات از طریق بذر (نهال‌های بذری) امروزه منسوخ شده است. دلایل متعددی چون طولانی شدن دوره نونهالی، بروز پر خاری و بی بذری یا کم بذری در برخی از ارقام هم-چون لیمو خارکی برای تغییر این رویه وجود دارد. بر این اساس در ازدیاد تجاری مرکبات، ابتدا اقدام به تهیه پایه مناسب از طریق کاشت بذر شده و سپس نهال‌ها در سال دوم رشد بوسیله پیوندک تجاری خاص، پیوند می‌شوند. بنابراین به دلیل مزیت‌های چون کوتاه کردن دوره نونهالی درخت و یا بهره‌مندی از ویژگی‌های پایه و پیوندک به دنبال دارد، این روش رایج‌ترین روش ازدیاد در بین تولیدکنندگان مرکبات است. ازدیاد مرکبات با قلمه نسبت به پیوند کمتر متداول است لیکن، استفاده از روش‌های کشت بافت (ریزازدیادی[1]) در برخی کشورها رایج شده است. ژنوتیپ‌های عمده‌ی از مرکبات به صورت تجاری در نقاط گسترده‌ی از جهان کشت و کار می‌شوند بنابراین تنش‌های زیستی و غیر زیستی زیادی تولید مرکبات را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی شامل اسیدها، آلکان‌ها، شوری خاک، خشکی، دمای بالا و یخ زدگی است و تنش‌های زیستی مانند نماتدها، قارچ‌ها، باکتری‌ها، فیتوپلاسما،

1- Micropropagation

ویروس‌ها و ویروئیدها تولید مرکبات را تحت تاثیر قرار می‌دهند. اهداف اصلاحی در مرکبات بیشتر در ارتباط پایه و پیوندک است (سوست و روسی، ۱۹۹۶). به جز تعداد معدودی از مرکبات، غالب آن‌ها با پیوند جوانه روی پایه مورد نظر رشد می‌کنند (ری، ۲۰۰۲). لایم‌ها جزء ارقامی از مرکبات هستند که بوسیله بذر تکثیر می‌یابند. اهداف اصلاحی پیوندک بیشتر بر قدرت رشدی، طول عمر درخت، باردهی مطلوب و منظم و کاهش ارتفاع درخت استوار است (سوست و روسی، ۱۹۹۶). اندازه مناسب میوه، عطر و طعم میوه، ضخامت پوست و فصل رسیدگی از صفات دیگری است که در ارتباط با اصلاح پیوندک حائز اهمیت است. به عنوان مثال در لیموترش بی‌بذری، افزایش میزان اسیدیته، نازکی پوست میوه و افزایش آب میوه از ویژگی‌های مطلوب محسوب می‌گردد. اهداف اصلاحی پایه شامل سازگاری بهتر پایه و پیوندک، کاهش اندازه درخت، مقاومت به آفات و بیماری‌ها، مقاومت به شوری و خشکی ومقاومت به سرما می‌باشد. طولانی بودن دوره نونهالی از دیگر مشکلات مرکبات بخصوص در ارقامی که بوسیله بذر تکثیر می‌یابند است.

دورگ‌گیری[۲]، دانهال‌های نوسلار[۳] و بیوتکنولوژی از روش‌هایی است که در اصلاح مرکبات به کار می‌رود. خودناسازگاری طولانی بودن دوره نونهالی و جنین‌های نوسلار[۴] و نبود مقاومت ذاتی به برخی از آفات و بیماری‌ها اصلاح سنتی مرکبات را با مشکل مواجه ساخته است. روش‌های بیوتکنولوژی که در اصلاح مرکبات به کار می‌رود شامل: کشت بافت، استفاده از نشانگرهای ملکولی، امتزاج پروتوپلاست، پلی‌پلوئیدی و انتقال ژن می‌باشد.

از نشانگرها جهت تشخیص دانهال‌های جنسی از نوسلار در شرایط کشت بافت استفاده می‌شود. در گزارش‌های زیادی از این روش جهت بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی در گونه‌های مختلف مرکبات

2- Hybridization
3- Nucellar seedling
4- Nucellar embryony

استفاده شده است (فدِریک و همکاران، ۱۹۹۸، گارسیا و همکاران، ۲۰۰۰، نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰). تنوع ژنتیکی در ۲۸ ژنوتیپ مرکبات اسیدی (ترش) استان هرمزگان و ۱۹ ژنوتیپ از مرکبات با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره SSR همراه با نشانگرهای مورفولوژیکی بررسی شده است (شرفی، ۱۳۹۰).

اختلاط پروتوپلاست حاصل از تخمک، برگ و دیگر بافت‌های گیاه مربوط به گونه‌های مختلف و باززائی گیاهان دورگ از پروتوپلاسم امتزاج یافته را اصطلاحا امتزاج پروتوپلاست[5] یا تلاقی سلول‌های سوماتیکی گویند. این روش برای تولید ارقام جدید که تولید آن‌ها با روش‌های اصلاحی متداول مشکل و یا حتی غیر ممکن است (فتوحی قزوینی، ۱۹۹۶) و یا نمی‌توان از طریق تولید مثل جنسی در تلاقی با خویشاوندی دور تولید بذر نمود (فارسی و باقری، ۱۳۸۳) استفاده می‌شود. تحقیقات زیادی منجر به دورگ‌های سوماتیکی از طریق امتزاج پروتوپلاست در مرکبات شده است (فتوحی قزوینی و همکاران ۱۳۷۷، گروسر و همکاران ۲۰۰۰ و ۲۰۰۳) همان طور که ذکر گردید روش فوق مبتنی بر جداسازی پروتوپلاست از بافت‌های مختلف و ادغام پروتوپلاست‌های مورد نظر و باززائی پروتوپلاست‌های امتزاج یافته از طریق فنون کشت بافت است.

ثبات در تعداد کروموزم‌ها برای بقای موجودات ضروری است اما گاهی تغییراتی در تعداد کروموزم‌ها می‌گردد که منجر به دو برابر شدگی یا حتی چند برابر شدگی تعداد کروموزم‌های پایه می‌گردد (پلی‌پلوئیدی[6]). حالت عمومی در جنس سیتروس۲n=۲x=۱۸ می‌باشد دو برابر شدگی در این جنس تولید گیاهان تتراپلوئیدی می‌کند که از نظر مورفولوژی و اندازه درخت و میوه ضعیف‌تر از گیاهان دیپلوئید هستند. تلاقی بین گیاه تتراپلوئید به عنوان والد مادری و گیاه دیپلوئید به عنوان والد پدری ایجاد گیاهان تریپلوئید می‌کند گیاهان تریپلوئید از هر حیث از گیاهان دیپلوئید قوی‌تر، پر رشدتر و ارزشمندتر هستند

5- Protoplast fusion
6- Polyploid

(ری و همکاران ۲۰۰۲) اما مشکل گیاهان تریپلوئید عقیم بودن این گیاهان است. وقتی والد پدری تریپلوئید باشد تشکیل بذور پوک فاقد آندوسپرم در میوه افزایش می‌یابد تحقیقات نشان می‌دهد این پدیده به دلیل عدم نمو طبیعی آندوسپرم و نیز جنین‌های تریپلوئید ایجاد می‌شود. چنین بذوری را می‌توان در محیط کشت قبل از بلوغ کامل بذر بازیافت نمود. چند برابر شدگی به طور مصنوعی و در شرایط درون شیشه‌ای در لیموترش استفاده شده است. کشت کالوس حاصل از آندوسپرم تریپلوئید، لیموترش و از طریق فنون کشت بافت لیموترش تریپلوئید تولیدشده است (سوست و همکاران ۱۹۹۶، سیمون و همکاران ۲۰۰۰).

مشکلات ناشی از بیماری‌ها و آفات و تنش‌های غیر زیستی مانند سرما و شوری محققان بیوتکنولوژی را بر آن داشته است که به تولید گیاهان تراریخت مقاوم بپردازند. همچنین، محققان با انتقال ژن‌های دخیل در امر گلدهی به ارقامی از مرکبات، موفق به کاهش دوره نونهالی در این ارقام شدند (کوستا و همکاران ۲۰۰۲، کی‌ایم و همکاران ۲۰۰۴، اندو و همکاران ۲۰۰۵، ری ۲۰۰۶، زانیک و همکاران ۲۰۰۷، سرورا و همکاران ۲۰۰۹). اساس انتقال ژن بر مبنای فنون کشت بافت می‌باشد که شامل انتقال ژن به گیاه باززا شده و سپس باززائی گیاه تراریخت است. لوپز و همکاران (۲۰۱۰) ژن مقاومت به ویروس تریستیزا به گیاهچه‌های مکزیکن لایم انتقال دادند و گیاهانی مقاوم به تریستیزا ایجاد نمودند.

به نظر می‌رسد تمامی روش‌های نوین اصلاح مرکبات و لیموترش نیازمند فنون کشت بافت است. روش‌های مانند انتقال ژن، امتزاج پروتوپلاست و پلی‌پلوئیدی کاملاً وابسته به کشت بافت هستند. در سال‌های اخیر بیماری‌های مانند شانکر باکتریایی مرکبات و جاروک لیموترش به مرکبات کشور، بخصوص لیموترش آسیب بسیاری وارد ساخته است و تولید این محصول در کشور را با چالش جدی مواجه ساخته است. ناتوانی اصلاح سنتی در حل این مشکل محققان را بر آن داشته است که از روش‌های نوین برای اصلاح لیموترش استفاده نمایند. به نظر می‌رسد قدم اول در اصلاح نوین لیموترش دستیابی به روش

مناسبی در کشت بافت این گیاه است به دلیل آنکه مرحله‌ی اول و آخر در روشی مانند انتقال ژن تولید گیاه باززا در شرایط درون شیشه‌ای است. همان طور که ذکر شد در سایر روش‌های نوین اصلاح مرکبات نیز کشت بافت نقش اساسی را دارا است. در حال حاضر نبود، روش کاربردی مناسب در باززائی لیموترش اصلاح این گیاه را با مشکل مواجه ساخته است.بنابراین دستیابی به روش کاربردی و علمی مناسب برای کشت بافت لیموترش امری لازم و ضروری است.

۱-۲-۱ گیاه شناسی و مورفولوژی مرکبات

مرکبات جزء راسته Graniales، خانواده Rutaceae و زیر خانواده Aurantioideae می‌باشد. در زیر خانواده Aurantioideae، ۲ قبیله Glauseneae و Citreae وجود دارد. قبیله Citreae شامل ۲۸ جنس می‌باشد که جنس Citrus و سایر جنس‌های نزدیک به آن شامل Fortunella، Poncirus، Eremocitrus، Microcitrus و Clymenia جزء این قبیله محسوب می‌شوند. در اواسط قرن نوزدهم، سوئینگل[۷] مرکبات را بر مبنای مشخصات ظاهری و مصرف به دو زیر خانواده Citreae و Clauseneae تقسیم کرد. سوئینگل درطبقه بندی خود مرکبات را به سه دسته مرکبات حقیقی، نزدیک به مرکبات حقیقی و مرکبات اولیه در یک زیر قبیله به نام Citrinae قرار داد. گروه حقیقی شامل ۶ جنس می باشد که جنس Citrus با گونه‌های لایم (*Citrus aurantifolia*)، لمون (*Citrus lemon*) و ۱۴ گونه دیگر در این گروه قراردارد (سوئینگل، ۱۹۶۷). در درختان مرکبات، گل‌های‌نر و ماده روی یک پایه هستند و گرده افشانی به طور طبیعی و به وسیله باد و حشرات انجام می‌شود. دوره گرده افشانی موثر ۲ تا ۵ روز پس از باز شدن کامل گل است. دمای مناسب برای گرده‌افشانی ۱۶ تا ۲۲ درجه سلسیوس است. یکی از ویژگی‌های مرکبات بکرزایی است. این پدیده در گروه ارقام پرتقال‌های واشنگتن ناول، نارنگی، پرتقال خونی و ... به‌طور منظم دیده می‌شود. چند جنینی از دیگر ویژگی‌های مرکبات و لیموترش است و ممکن است از یک بذر ۳ تا ۵

7- Swingle

نهال سبز شود که برخی از آنها تمام صفات مادری را نیز دارند و برخی به دلیل تفرق صفات ویژگی‌های مادری را ندارند (خوشخوی و همکاران، ۱۳۷۶).

گیاهان مرکبات به صورت بوته‌ایی، درختچه‌ایی با شاخ و برگ‌های متراکم و یا درختی با گل‌های سفید مایل به ارغوانی دیده می‌شوند. گل‌ها در مرکبات دو جنسی (Hermaphrodite) می‌باشند که به صورت منفرد یا دسته کوچک در محور برگ روی شاخه یک ساله تشکیل می‌شوند. کاسبرگ‌ها پایا بوده و گلبرگ‌ها درون جوانه ابتدا به هم چسبیده و سپس فاصله می‌گیرند. پرچم‌ها از پایین به هم چسبیده و در بالا از هم باز هستند. هم‌چنین بساک‌ها در کنار یا نزدیک به سطح کلاله قرار داشته و مادگی را احاطه می‌نمایند. تخمدان در گونه‌ها و جنس‌های مختلف، متفاوت و از ۸-۱۵ برچه تشکیل شده است. زمان گلدهی تحت تاثیر شرایط محیطی است و به طور معمول در اوایل بهار گل می‌دهند. دانه گرده مرکبات چسپناک بوده و همچنین گل‌ها به دلیل داشتن شهد زیاد و عطر فراوان برای حشرات جذاب هستند که این امر می‌تواند در گرده افشانی موثر باشد (قزوینی و مقدم، ۱۳۸۵).

۱-۲-۲ لیموترش

لیموترش و لیمو عمانی در حدود ۱۲۰۰ تا ۱۳۰۰ سال پیش و توسط اعراب به ایران آورده شده است (الهی نیا، ۱۳۸۳). در بین مرکبات لیموترش در دسته‌ی گیاهان گرمسیری طبقه بندی می‌شود و مناطق عمده کشت و کار لیموترش در ۲۵ درجه عرض شمالی و ۲۵ درجه عرض جنوبی است. در بررسی کشورهای تولید کننده مرکبات به تفکیک، مشخص می‌شود که از نظر تولید لیموترش به ترتیب کشورهای هند، مکزیک، آرژانتین، برزیل، چین، ایران، اسپانیا، ترکیه و ایالات متحده آمریکا در صدر تولید کنندگان لیموترش در دنیا هستند (فائو، ۲۰۰۸)، ایران با تولید ۳۹۰,۳۳۶ تن در رتبه‌ی ششم قرار گرفته است (فائو، ۲۰۰۸). لیموترش ۳۲,۲۰۱ هکتار از سطح اراضی کشت مرکبات کشور را شامل می-

شود. تولید مرکبات کشور حدود ۴ میلیون تن در سال برآورد شده است که ۳۳۶,۳۹۰ تن آن سهم تولید لیموترش می‌باشد. راندمان تولید لیموترش ۱۱۶۱۹/۵ در هکتار می‌باشد. لیموترش تنها در استان‌های هرمزگان، فارس، کرمان و منطقه جیرفت و کهنوج کشت و کار می‌شود (آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۳۸۷). در ایران لیموترش (لایم) با استفاده از بذر و لیمو خارکی با استفاده از پیوند تکثیر می‌یابد.

مهمترین مصرف لیموترش، تهیه آب لیمو می‌باشد که در صنایع غذائی کاربرد دارد. از اسانس لیموترش ماده‌ی سیترونلال که آرامش دهنده است و در درمان افسردگی استفاده می‌شود استحصال می‌شود (مرتضوی و همکاران ۱۳۸۳، نصیری و همکاران ۱۳۸۴). لیموترش دارای مقادیر بسیاری ویتامین‌های آ، ب، ث و موادی چون پتاس، فسفر و کلسیم است. اترهای چرب و الکل‌های خوشبویی که در برگ، گل و میوه‌های آن یافت می‌شود، در ساخت مواد آرایشی و خوراکی به کار می‌رود (قزوینی و مقدم، ۱۳۸۵). از پوست هر تن لیموترش ۴ تا ۵ لیتر اسانس به دست می‌آید که در صنایع غذائی و آرایشی بهداشتی به کار برده می‌شود. از بذر لیموترش روغن صنعتی استخراج می‌شود که در صنایع هواپیمایی از آن استفاده می‌شود (ابراهیمی، ۱۳۸۶).

لایم (lime) *Citrus aurantifola* توسط عرب‌ها به ایران، اروپا و آفریقا آورده شده است و بومی مناطق گرمسیری است لذا کشت آن نیز به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مرطوب با دمای بالاتر از ۲- تا ۳- درجه سانتی‌گراد محدود می‌شود. این گونه به دو دسته‌ی اسیدی و غیر اسیدی تقسیم می‌شود. ارقام اسیدی به دو گروه میوه‌های نسبتاً بزرگ و گروه میوه‌های نسبتاً کوچک تقسیم می‌شوند. درختان این گونه بسیار قوی، پررشد، عادت به رشد عمودی و نیز ایجاد شاخه‌های پراکنده دارد. پرتیغی از مشخصه‌های مهم است. رنگ گل در ارقام مختلف این گونه متفاوت و به رنگ‌های سفید، صورتی و ارغوانی گزارش شده است. پوست میوه آن نازک، زرد رنگ و در عرض سال به طور نامنظم می‌رسند. رنگ بخش خوراکی سبز و ترش مزه است (شکل۱-۱ الف). Tahiti lime, Persian, Bears, West Indian, Mexican, Key

lime از ارقام مهم این خانواده هستند که در ایران کشت و کار می‌شوند (هودگسون، ۱۹۹۷). لایم در بین تولید کنندگان ایران به لیموترش معروف است.

لیموترش(*Citrus limon* Burm) درختان لیمو بومی شرق هیمالیا و هند هستند. گفته می‌شود که دو-رگ ناشی از تلاقی لایم و بالنگ است (بارست و رودس، ۱۹۷۶). پراکندگی این گونه در مناطق خشک و نیمه خشک در نواحی گرمسیری با دمای زمستان بالاتر از ۴- درجه سانتی‌گراد مشاهده می‌شود. درختان این گونه نسبت به سایر گونه‌های مرکبات حساسیت بیش‌تری نسبت به دمای پائین دارند (یلونسکی،۱۹۹۱). درختان این گونه قوی بوده و در مناطق گرمسیری دارای رشد عمودی هستند. شاخه-ها نیز اغلب پر تیغ و دارای گل‌های قرمز کامل هستند. پر تیغی به نوع رقم، شرایط رشد و سن درخت بستگی دارد. میوه لیموها در تابستان، پائیز و زمستان قابل برداشت هستند. بعضی از ارقام لیمو بذردار و برخی بی بذر و درصد چند جنینی بین ۰-۱۰۰ درصد است. سه گروه بزرگ لیمو فمینولو[۸]، ورما[۹] و سیسیلی[۱۰] هستند. از ارقام متداول سیسیلی در ایران رقم، محلی اورکا[۱۱] و لیسبون[۱۲] است. رقم لیسبون (خارکی) در سال‌های ۱۳۴۳-۱۳۴۲ شمسی وارد ایران شد. میوه‌ها دارای اندازه متوسط بیضوی کشیده با قاعده مخروطی و گردن نا مشخص هستند. رنگ پوست میوه به هنگام بلوغ زرد رنگ و ضخامت آن زیاد است. بافت میوه ترد، آبدار و خیلی ترش مزه است (شکل۱-۱ ب). این رقم مقاوم‌ترین رقم لیمو نسبت به تحمل شرایط نامساعد محیطی مانند سرما، گرما و بادهای تند و داغ (شرایط حاکم در جنوب ایران) است. در ایران تولیدکنندگان رقم لیسبون را تحت عنوان لیمو خارکی می‌شناسند.

8- Femminello
9- Verma
10- Sicillian
11- Eureka
12- Lisbon

از جهت دیگر ارقامی از مرکبات مانند لیمو خارکی که کم بذر هستند تنها از طریق پیوند تکثیر می‌یابند که این روش نسبت به روش کشت بافت و ریزازدیادی زمان‌بر و دشوارتر است بنابراین کشت بافت علاوه بر اصلاح لیموترش در ازدیاد آن در سطح تجاری نیز استفاده می‌گردد.

شکل ۱-۱: میوه‌ی لایم (الف) و لیسبون (لیمو خارکی) (ب)

۱-۳ کشت بافت

واژه کشت بافت گیاهی به طور کلی به کشت درون شیشه‌ای تمام بخش‌های گیاه (سلول، بافت و اندام) در شرایط استریل گفته می‌شود. امروزه مطالعات زیادی در ارتباط با فنون کشت بافت گیاهی در سطح جهانی در حال انجام است. از انواع روش‌های کشت بافت می‌توان به کشت جنین، کشت ریزنمونه‌های جدا شده از اندام‌های گیاهی، کشت سوسپانسیون (کشت سلول یا مجموعه‌ای از سلول‌ها که به حالت تعلیق در محیط کشت مایع قرار می‌گیرند)، کشت پرتوپلاست (کشت سلول‌هایی که دیواره سلولی آنها برداشته شده است)، کشت بساک (کشت بساک بالغ یا دانه گرده به منظور دستیابی به بافت‌های هاپلوئید) و کشت اندام نام برد (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

باززائی گیاه از بافت مریستم در بسیاری از گونه‌ها امکان‌پذیر است. به عنوان مثال با تغییر غلظت و یا ترکیب هورمون‌های گیاهی در محیط کشت و القا جوانه انتهایی و جانبی، ساقه‌های چندتایی تشکیل می-شوند. ساقه‌های ایجاد شده را می‌توان جدا کرد و برای تشکیل گیاهچه در محیط کشت ریشه‌زائی قرار داد ریزازدیادی). در بعضی از گونه‌ها می‌توان مستقیماً از طریق اندام‌زائی نمونه‌ی گیاهی که از بافت غیر مریستمی و نابجا (باززائی مستقیم) و یا به صورت غیر مستقیم از طریق بافت کالوس، گیاهان باززا تولید کرد (باززائی غیر مستقیم). در باززائی به روش غیر مستقیم با تغییر نسبت اکسین به سیتوکینین، بافت کالوس به سمت شاخه‌زائی و یا جنین‌زائی هدایت می‌شود (جنین‌زائی سوماتیکی). جنین‌زائی در بیشتر موارد از طریق نمو جنین‌های زایشی به وجود می‌آیند. جنین‌های زایشی از سلول تخم ایجاد می‌شوند در شرایط کشت بافت می‌توان جنین‌های نارس زایشی، جنین‌های نرزا[۱۳] [(کشت درون شیشه‌ای میکروسپورها (دانه‌های گرده نابالغ)] و جنین‌های رویشی از بافت رویشی (جنین‌زائی سوماتیکی) ایجاد نمود. برای القا جنین‌زائی به تغییر غلظت هورمون، عوامل رشد و تیمار با تنش نیاز است (تنش دمائی، نوری و خشکی). اینکه جنین به طور مستقیم از یک سلول و یا بافت کالوس تشکیل گردد به ماهیت بافت ریزنمونه و تیمار القائی بستگی دارد. مراحل تشکیل جنین‌زائی رویشی در شرایط کشت بافت مشابه جنین‌زائی زایشی در شرایط طبیعی است و تنها مرحله‌ی آخر که جذب آب است در جنین زائی رویشی وجود ندارد (شکل، ۱-۲).

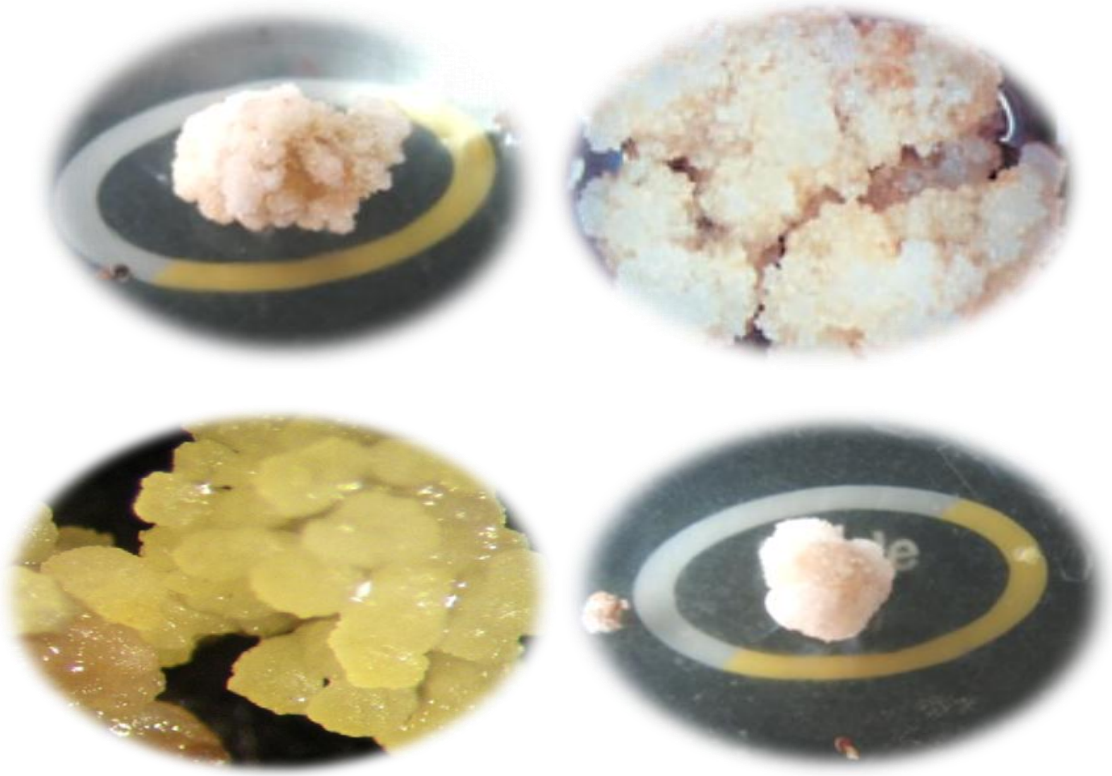
شکل ۱-۲: مراحل تشکیل جنین رویشی

13- Androgenic embryos

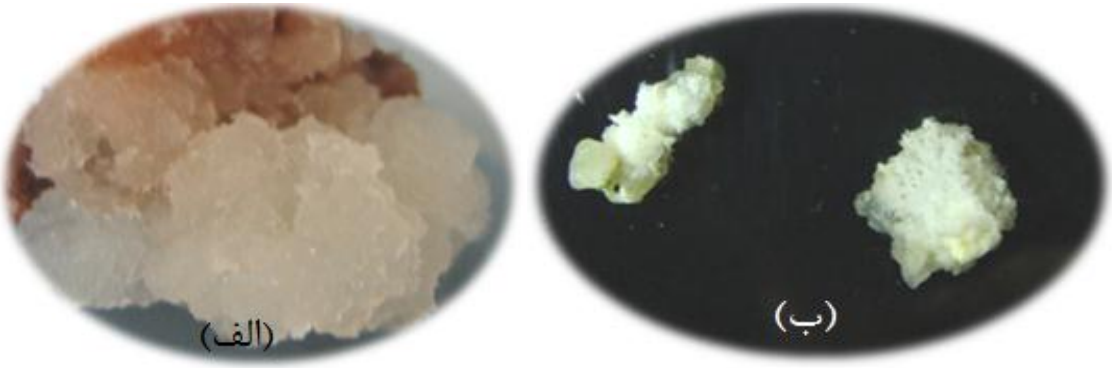
بافت پینه از نظر ظاهر و جنبه‌های فیزیکی تنوع زیادی دارد. این تنوع تحت تاثیر بافت والدی ریزنمونه، سن کالوس، شرایط رشدی و نوع تیمارهای هورمونی به کار رفته در مرحله القا و رشد کالوس است. بافت کالوس ممکن است سفید، سبز و یا به دلیل وجود آنتوسیانین دارای رنگ‌های متفاوتی باشد. سلول‌های کالوس ممکن است فشردگی زیادی به هم نداشته باشند و حالت سست داشته باشند (به آسانی خرد و متلاشی شوند) و یا اینکه لیگنینی و حالت سفت و متراکم به خود بگیرند (غیر سست) (شکل ۱-۳) و یا ممکن است به صورت پودری و یا آبکی باشند (شکل ۱-۴ الف و ب). علاوه بر این کالوس می‌تواند جنین-زا بوده و یا غیر جنین‌زا باشد. کالوس جنین‌زا توانائی تولید جنین به طور خود به خود یا تحت شرایط مناسب را دارا هستند. از کالوس‌های غیر سست و شکننده جنین‌های رویشی و اندام‌ها باززا می‌شوند و از کالوس‌ها با بافت شکننده غیر قابل تمایز بوده و تنها قادر به تولید جنین‌های رویشی است (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵). باززائی به دلیل خاصیت پرتوانی سلول‌ها امکان‌پذیر است. پرتوانی به توانایی سلول‌های گیاهی در تبدیل شدن به گیاه کامل از طریق فرآیندهای مشخص و تحت شرایط رشدی مناسب اطلاق می‌گردد. گیاه باززا شده کاملاً مشابه گیاهی است که سلول‌های آن در باززائی مورد استفاده قرار گرفته است. امروزه باززائی گیاه از طریق روش‌های کشت بافت، اساس روش‌های فناوری زیستی و اصلاح گیاهی است (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

تمامی کشت بافت‌های گیاهی در دو مرحله انجام می‌گیرد در ابتدا بخش مناسبی از گیاه به عنوان ریزنمونه انتخاب می‌شود و متعاقب آن کشت ریزنمونه، در محیط کشت مناسب انجام می‌گیرد تا توانایی انجام فعالیت‌های زیستی و تولید بافت‌های جدید را بیابد (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

باززائی مستقیم از معمول‌ترین روش‌های باززایی در مرکبات می‌باشد. باززایی موفق به عوامل مختلفی بستگی دارد، از جمله نوع ریزنمونه، ژنوتیپ و محیط کشت مورد استفاده برای باززائی است. جنین‌زائی سوماتیکی روش دیگری است که در مرکبات به منظور باززائی استفاده می‌گردد.



شکل-۱-۳: کالوس هایی با بافت فشرده (کریمی ۱۳۸۹).



شکل ۱-۴: انواع کالوس الف) کالوس آبکی ب) کالوس پودری (کریمی ۱۳۸۹).

در ارقام پرتقال، نارنج و گریپ فروت جنین‌زائی سوماتیکی گزارش شده است (گوربل ۲۰۰۰ ، لی ۲۰۰۳ و اندو ۲۰۰۵) ولی تاکنون گزارش معتبری از جنین‌زائی سوماتیکی در لیموترش ارائه نشده است.

۱-۳-۱ ریزنمونه

ریزنمونه‌های متفاوتی مانند کالوس، قطعات برگی، بذر، گره، اپی‌کوتیل و قطعات میان گره ساقه به طور معمول در باززائی مرکبات استفاده می‌گردد (موری و همکاران، ۱۹۹۲، هیداکا و اومرا، ۱۹۹۳، کانیوشی و همکاران، ۱۹۹۴).

در گزارشات مختلفی از شاخه‌های ۴ تا ۱۲ ماهه ارقام مختلفی از مرکبات هم‌چون لیموترش، پرتقال[۱۴]، ماندارین[۱۵]، رانگاپور لایم[۱۶] و سیترومیلو به عنوان منبع ریزنمونه استفاده شده است. در این تحقیقات قطعات میان گره ساقه به ابعاد ۱ تا ۲ سانتی‌متر تقسیم و در محیط کشت شاخه‌زائی قرار داده شد (البحرانی ۲۰۰۲، آلمیدا و همکاران ۲۰۰۲، سرورا و همکاران ۲۰۰۷ و بالستر و همکاران ۲۰۰۸). تاکنون گزارشی از باززائی غیرمستقیم، قطعات شاخه در مرکبات گزارش نشده است. اپی‌کوتیل ریزنمونه دیگری است که به طور عمده در باززائی مستقیم و غیر مستقیم مرکبات به کار می‌رود. در این روش بذرها پس از ضدعفونی در محیط کشت جوانه زنی (MS[۱۷]) کشت می‌گردند، ۴ تا ۸ هفته پس از جوانه زنی بذر، اپی‌کوتیل به قطعات ۱ تا ۲ سانتی‌متر تقسیم می‌گردد. ریزنمونه‌های حاصل به محیط کشت القا شاخه-زائی و یا کالوس‌زائی انتقال می‌یابند. در تحقیقات جداگانه‌ی بذور پرتقال، سیترومیلو، لیموترش، نارنج[۱۸]، لمون[۱۹]، پوملو[۲۰] و پونکان[۲۱] در محیط کشت جوانه زنی بذر کشت شدند و در زمان‌های متفاوت ۳، ۵، ۶ و ۸ هفته پس از جوانه زنی بذر از قطعات اپی‌کوتیل گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای ریزنمونه

14- *C. sinensis*
15- *C. reticulate* Blanco (mandarin)
16- Rangapur lime
17- Murashige & skoogs
18- *C. aurantium*
19- *C. limons* (limon)
20- *C. grandis* (pomelo)
21- *C. reticulate* (ponkan)

دریافت گردید (کی‌ایم و همکاران ۲۰۰۴، اندو و همکاران ۲۰۰۵، مختار و همکاران ۲۰۰۵، فانگ و همکاران ۲۰۰۸، لوئیزا و همکاران ۲۰۰۹ و لی یانگ و همکاران ۲۰۱۱) در تحقیق دیگری بذور پرتقال در محیط کشت جوانه زنی کشت شده و سپس از برگ‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای برای باززائی غیرمستقیم استفاده گردید (سرورا و همکاران ۲۰۰۹). قطعات میان‌گره و قطعات اپی‌کوتیل به طور عمده برای انتقال ژن و باززائی در مرکبات استفاده شده است.

۱-۳-۲ ضدعفونی ریزنمونه‌ها

عدم ضدعفونی مناسب ریزنمونه‌ها منجر به آلودگی‌های باکتریایی و قارچی می‌گردد که این امر منجر به از بین رفتن ریزنمونه‌های کشت شده، می‌شود و باید توجه داشت که اگر ریزنمونه‌ها استریل نشوند، ٪۹۵ کشت‌ها آلوده خواهند شد بنابراین تهیه ریزنمونه‌های استریل برای کشت بافت امری ضروری است. دستیابی به روش ضدعفونی مناسب را می‌توان مهم‌ترین مرحله در کشت بافت ذکر نمود که با توجه به سن، منبع ریزنمونه و شرایط رشدی در هر گونه گیاهی متفاوت می‌باشد. به دلیل اینکه اندام‌ها و بافت-های زنده گیاه در دمای بالا قادر به حفظ قابلیت‌های بیولوژیکی خود نیستند، برای ضدعفونی آن‌ها از محلول‌های ضدعفونی کننده استفاده می‌گردد. محلول‌های ضدعفونی کننده‌ای، مناسب هستند که علاوه بر از بین بردن آلودگی‌های سطحی و قارچی به بافت گیاه آسیب نرساند. محلول‌هایی برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها به کار می‌رود در جدول، ۱-۱ آمده است. محلول‌های مورد استفاده برای سترون کردن ریزنمونه‌ها نباید به بافت گیاهی آسیب برساند اما در این حال هر آلودگی قارچی یا باکتریایی را از میان ببرد (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

بذر مرکبات و شاخه‌های جدا شده از نهال‌ها به طور معمول در هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ یا ۵٪ به اضافه توین[۲۲] ۱۰ یا ۲۰ با درصد حجمی ۰/۰۱-۰/۱ برای مدت ۱۰-۲۰ دقیقه غوطه ور شده، سپس ۳ مرتبه با

22- Tween

آب دو بار تقطیر استریل شستشو داده می‌شوند (هر بار بـه مـدت ۵ دقیقـه) (البحرانـی ۲۰۰۲، آلمیـدا و همکاران ۲۰۰۲،کی ایم و همکاران ۲۰۰۳، انـدو و همکـاران ۲۰۰۵، مختـار و همکـاران ۲۰۰۵، سـرورا و همکاران ۲۰۰۷، فانگ و همکاران ۲۰۰۸، بالستر و همکاران ۲۰۰۸ و لی یانگ و همکاران ۲۰۱۱). لوئیزا و همکاران (۲۰۰۷) بذر پرتقال و سیترواملو را به مدت ۲ دقیقه در الکل ۷۰٪ پیش از انتقال به هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ قراردادند.

۱-۳-۳ محیط کشت

در باززایی مرکبات از محیط کشت‌های MS، MT، EMES[۲۳] و White استفاده شده است (البحرانی، ۲۰۰۱ ، دی دی و همکاران، ۲۰۰۳، ماگدالینا و همکاران، ۲۰۰۷، وانگ و همکاران، ۲۰۰۷، لویزا و همکاران، ۲۰۰۹، گروسر و همکاران، ۲۰۱۰، یانگ و همکاران، ۲۰۱۱). در باززایی لیمو ترش از محیط کشت MS و White استفاده شده است. (آگراوال و همکاران، ۱۹۹۳، پنا و همکاران، ۱۹۹۷، البحرانی، ۲۰۰۱).

۱-۳-۴ تنظیم کننده‌های رشد در مرحله شاخه‌زائی

باززائی گیاهان از طریق اندام زائی بافت‌های متفاوت، در بسیاری از ارقام مرکبات گزارش شـده اسـت. در بیشتر تحقیقات صورت پذیرفته در ارتباط با کشت بافت و بـاززائی مسـتقیم مرکبـات از هورمـون بنزیـل آمینو پورین (BAP[۲۴]) به میزان ۱ و یا ۳ میلی‌گرم در لیتر به تنهایی و یا همراه با اکسین اسـتفاده شـده است. بعضی از محققان اضافه نمودن نفتالیک استیک اسـید (NAA[۲۵]) بـه محـیط کشـت بـاززائی را بـر شکل‌دهی شاخه مهم گزارش کرده‌اند در حالی که بعضی دیگر عدم تـاثیر آن را گـزارش نمـوده‌انـد. ایـن نتایج متناقض به دلیل استفاده از گونه‌های مختلف مرکبات می‌باشد (پنا و همکاران، ۱۹۹۷).

23 - Embryogenic medium suspension
24 - 6- Benzylaminopurin
25 -Naphthaleneacetic acid

جدول ۱-۱: غلظت مواد ضد عفونی کننده و زمان لازم جهت ضد عفونی اندام گیاهی (فروتن و وادیدار، ۱۳۸۵).

مواد ضد عفونی کننده	غلظت(٪)	زمان(دقیقه)	توضیحات
هیپوکلریت سدیم	۰/۵-۵	۵-۳۰	فعالیت آن به دلیل وجود کلرین و اکسیدکنندگی است.
هیپوکلریت کلسیم	۹-۱۰	۵-۳۰	نوعی ماده‌ی جامد که باید حل وسپس صاف شود.
سفید کننده تجاری	۱۰-۱۲	۱۰-۲۰	حاوی حدود ۵٪ هیپوکلریت سدیم است.
پراکسید هیدروژن	۳-۱۲	۲-۳	اثر آن به دلیل خاصیت اکسیدکنندگی آن است.
کلرید بنزالکونیوم	۰/۰۱ -۱/۰	۳-۵	اثر گندزدائی کاتیونی (کاهش دهنده کشش سطحی) که از غشا بیولوژیکی عبور می‌کند.
کلرید جیوه	۰/۱-۱	۳-۵	پروتئین‌هارا واسرشت می‌کند. بسیار سمی بوده و به روش‌های ویژه‌ای برای نابود کردن محلول‌های زائد نیاز دارد.
آنتی بیوتیک	غلظت‌های مختلف	زمان‌های مختلف	

البحرانی(۲۰۰۲) در باززائی ریزنمونه‌های لیموترش تیمارهای هورمونی مختلفی به کاربرده است و در نهایت تیمار هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین[۲۶] و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA را به عنوان بهترین تیمار هورمونی باززائی لیموترش معرفی نموده است. والدمیر(۲۰۰۳) ۳ میلی-گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵میلی‌گرم در لیتر NAA برای باززائی پرتقال و سیترانج[۲۷] استفاده نموده است. از ۱ میلی‌گرم در لیتر BAP به همراه ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA در باززائی ریزنمونه‌های ارقام رانگاپور لایم، پرتقال و سیترواملو استفاده شده است (زانگ، ۲۰۰۶). در باززائی مستقیم ریزنمونه‌های برگ پرتقال از ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA استفاده شده است(خان،۲۰۰۹).

در باززائی غیر مستقیم مرکبات و دریافت کالوس از غلظت‌های متفاوت (۰/۲- ۲) میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D استفاده شده است (اینیت و همکاران، ۱۹۸۱، آگراوال و همکاران، ۱۹۹۳، پنا و همکاران، ۱۹۹۷، اندو و همکاران، ۲۰۰۵، ماگدالین و همکاران ۲۰۰۷). بیشتر تحقیقات غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D را مناسب‌ترین غلظت در کال‌زائی مرکبات گزارش نموده‌اند.

۱-۳-۵ تنظیم کننده‌های رشد در مرحله القا ریشه‌زائی

ریشه‌زائی گیاهان باززا شده در مرکبات عموماً دشوار نیست و در محیط کشت MS و ۱/۲ MS بدون تنظیم کننده رشد و یا حاوی تنظیم کننده رشد گزارش شده است. اکسین‌ها گروهی از تنظیم کننده‌های رشد هستند که در ریشه‌زائی استفاده می‌گردند. غلظت‌های متفاوتی از هورمون‌های NAA، ایندول بوتیریک اسید (IBA[۲۸]) و ایندول استیک اسید (IAA[۲۹]) در ریشه‌زائی ارقام مختلفی از مرکبات گزارش

26- Kinetin
27- *C. sinensis* × *Poncirus trifoliate* (Carrizo citrange)
28- Indol -3- butyric acid
29-Indole acetic asid

شده است. (اینست و همکاران، ۱۹۸۱، گوربل و همکاران، ۲۰۰۰، البحرانی، ۲۰۰۲ ، دی دی و همکاران، ۲۰۰۳، ماگدالین و همکاران، ۲۰۰۷، فانگ و همکاران، ۲۰۰۷).

در جدول، ۱-۲ خلاصه‌ی برخی از تحقیقاتی که در خصوص کشت بافت مرکبات طی سال‌های اخیر صورت پذیرفته است آورده شده است. در این جدول گونه‌ای که کشت شده است به همراه نوع ریزنمونه، محیط کشت و هورمون‌های به کار رفته ذکر گردیده است).

جدول۱-۲: خلاصه تحقیقات کشت بافت در مرکبات

نمونه گیاهی	ریز نمونه	محیط کشت	هورمون و غلظت کاربردی	منبع
C. sinensis	کالوس	MS MT	IAA 4-CPAA	Erner et al., 1975
C.limon *C. reticulata* *C. paradise* *C. sinensis*	گل	MS	2, 4-D picloram	W.Einet et al., 1981
Citrus aurantium	سلول‌های سوماتیکی بافت خورش	MT MS		Gavish et al., 1991
C. aurantifolia	کالوس	MS, White	BA (0, 0-02, 0-002 mg/l) 2,4,D(0, 0-02, 0-002 mg/l)	Agrawal et al., 1993
C. deliciosa	بافت خورش جدا شده از کالوس جنین‌زا	MS		Cabasson et al., 1995
C. aurantifolia	ساقه	MS	1 mg/l BAP 2 mg/l 2, 4-D 2 mg/l IBA	Pena et al., 1997
C. aurantium	کالوس تشکیل شده از کامبیوم	MS	NAA BAP	Riadh ghorbel et al., 2000
C. aurantifolia	گره	MS	(0, 2.2, 4.4, 8.8) µM BAP (0, 2.7, 5.4) µM NAA (0, 2.3 4.6)µM kinetin	Abdulaziz ., 2001
C. sinensis	کالوس جنین‌زا	MT	BAP (0.5 mg/l) NAA (0.1 mg/l)	A .omar et al., 2003
C. jambhiri Lush *C. aurantium*	کالوس جنین‌زا بذر	MS	0.2 mg/ml	Endo et al., 2005
۲۰ گونه متفاوت از مرکبات	تخمدان لقاح نیافته	MT		Zhangjun et al., 2006

C. madurensis	خامه و کلاله جدا شده از گل‌های شکوفا نشده	MS	12 µM 2, 3MDP4 12 µM BAP 12 µM PBU	Siragusa et al., 2007
C. sinensis *C. Limon* *C.rtticulata* *C. grandis*	نوک جوانه جانبی	MT	2.2 µM BA 1 µM IBA	Fang et al., 2007
Clementine mandarin C. volka *merina* *C. aurantium* *C. jambhiri Lush*	ساقه	MS	3 mg/l BAP 2 mg/l IBA 1 mg/l 2, 4-D	Magdalena et al., 2007
C. sinensis *C. sinensis* × *Poncirus trifoliata*	بذر قطعات میان گره	MS	3 mg/l (BAP)	Ballester et al., 2008
C. sinensis	بافت خورش جدا شده از کالوس جنین‌زا	MT		Xiao et al., 2008
C. sinensis *Citrus paradisis* Macf× *Poncirus trifoliate* L. Raf	بذر قطعات اپی‌کوتیل	MS	BAP	Luiza et al., 2008
Clemenules *C. moncada* *C. marisol* *C. fina*	جوانه از ژنوتیپ‌های غیرآپومیکسی	MS		Aleza et al., 2009
C. sinensis *C. reticulate* *C. amblycarpa* Hamlin', 'Valencia, and 'OLL8' *C. depressa*	تخمدان لقاح نیافته	EMES MT		Dutt et al., 2010
C. sinensis	بذر	MS	3 mg/l BAP 1 mg/l BAP	Liyang et al., 2010

فصل دوم

مواد و روش‌ها

در این فصل به بررسی مواد وروش‌های به کاربرده شده در این تحقیق پرداخته شده است به طور کلی این تحقیق به ۳ مرحله تقسیم می‌شود که خلاصه‌ی هر بخش آورده شده است.

آزمایش اول: با کشت ریزنمونه‌های گره و میان گره لایم (ژنوتیپ جهرم و هرمزگان) و لیمو خارکی (از نهال‌های ۸-۱۲ ماهه موجود در گلخانه دانشگاه شهید بهشتی به عنوان منبع گیاهی استفاده شد) در محیط کشت پایه MS و MT حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به منظور باززائی غیر مستقیم استفاده شد.

آزمایش دوم: با کشت ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای لایم (ژنوتیپ جهرم و هرمزگان) و لیمو خارکی در محیط کشت پایه MS و با ۱۳ تیمار هورمونی (۱، ۲، ۸، ۱۶میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۱، ۲، ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک استیک اسید، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک استیک اسید و ۱ و ۲ میلی-گرم در لیتر 2ip به منظور باززائی غیر مستقیم استفاده شد.

آزمایش سوم: به بررسی باززائی مستقیم ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای لایم در محیط کشت پایه MS با ۱۲ تیمار هورمونی با غلظت‌های متفاوتی از هورمون‌های BAP، NAA، 2ip ، زئاتین و کینتین پرداخته شده است.

۲-۱- مواد

این تحقیق با هدف بررسی توانایی باززائی از ریزنمونه‌های لایم و لیمو خارکی (Lisbon) در محیط کشت پایه MS و MT[۳۰] با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های BAP، 2,4-D، NAA، 2ip[۳۱]، زئاتین[۳۲] و کینتین طی سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ در آزمایشگاه گیاهی و اتاق رشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام گرفت.

۲-۱-۱- منبع گیاهی

از نهال‌های ۸-۱۲ ماهه‌ی دو ژنوتیپ لایم (جهرم و هرمزگان) و لیمو خارکی موجود در گلخانه‌ی دانشگاه شهید بهشتی تهران به عنوان منبع گیاهی در آزمایش اول استفاده شد(شکل ۲-۱).

بذور لایم ژنوتیپ جهرم از مرکز تحقیقات مرکبات جهرم تهیه شد و بذور ژنوتیپ هرمزگان از میوه‌های جمع‌آوری شده از باغات شمال و جنوب هرمزگان که در تاریخ ۹۰/۶/۱ جمع‌آوری شده بود تهیه شد. بذور لیمو خارکی نیز از میوه‌های جمع‌آوری شده از باغات حاجی‌آباد هرمزگان و اکبرآباد فسا تهیه گردید.

۲-۱-۲- مواد شیمیایی

تمامی هورمون‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Ducfa هلند تهیه گردید. ویتامین‌ها و مواد پایه که در تهیه محیط کشت MS و MT استفاده گردید از شرکت Sigma آمریکا خریداری شد.

30- Murashige & Tucker
31 - 2 isopentenyl adenine
32- Zeatin

شکل۲-۱: نهال لایم (الف) و لیمو خارکی(ب)

۲-۱-۳- تجهیزات

از تجهیزات موجود در آزمایشگاه گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک شامل لامینار ایرفلو، اتوکلاو، ترازو، شیشه‌ی درب آبی و غیره استفاده شد.

۲-۱-۴- نرم افزارها

تمامی آزمایشات انجام شده در قالب طرح فاکتوریل بر مبنای طرح پایه کاملاً تصادفی و بدون در نظر گرفتن تیمار شاهد صورت پذیرفت. برای بررسی و ارزیابی داده‌ها از نرم افزارهای SAS و spss استفاده شده است. ارزیابی داده‌های کمی با استفاده از نرم افزار SAS و ارزیابی داده‌های کیفی با استفاده از نرم افزار spss انجام شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تهیه محلول پایه و آماده سازی محیط کشت

برای تهیه محیط‌های کشت، ابتدا محلول‌های پایه ترکیبات مورد استفاده محیط کشت به‌صورت جداگانه تهیه شدند، با مشاهده هر گونه تغییر رنگ، وجود رسوب و یا مواد زائد تمامی محلول‌های پایه دوباره تهیه گردیدند. برای تهیه محلول‌های پایه عناصر پر مصرف، نمک‌های این عناصر به طور جداگانه به میزان ۱۰ برابر مورد نیاز برای یک لیتر محیط کشت، توزین و سپس در ۱ لیتر آب مقطر حل شدند. حجم نهایی این محلول‌ها ۱۰ برابر مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محیط کشت بود. محلول پایه نمک‌های عناصر کم مصرف به طور جداگانه به میزان۱۰۰۰ برابر غلظت نهایی برای تهیه یک لیتر محیط کشت تهیه شدند. محلول پایه آهن به میزان ۲۰۰ برابر غلظت مورد نیاز تهیه شد. به دلیل حساسیت این ماده به نور ظرف

حاوی آن با فویل آلومینیوم پوشانده شد. برای تهیه این محلول پایه ابتدا ۷/۴۴ گرم $Na_2EDTA.2H_2O$ در ۹۰۰ میلی لیتر آب حل شد، سپس طی حرارت دهی محلول تا دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و هم زدن آن، به تدریج ۱/۸۶ گرم $Fe_2SO_4.7H_2O$ به آن اضافه گردید. تا حل شدن کامل، هم زدن ادامه داده شد و پس از آن که محلول خنک شد، حجم محلول به یک لیتر رسانده شد. محلول‌های پایه ویتامین‌های MS (۱۰۰۰ برابر غلظت) ساخته شدند (جدول ۲-۱).

محلول‌های پایه برای تنظیم کننده‌های رشد (2,4-D، BAP، NAA، 2ip، زئاتین و کینتین) با غلظتی ۱۰۰۰ برابر مورد نیاز برای یک لیتر محیط کشت ساخته شدند و تمامی محلول‌های پایه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تهیه یک لیتر محیط کشت، ابتدا مقداری آب مقطر (حدود ۴۰۰ سی سی) با EC پایین داخل یک استوانه مدرج یک لیتری ریخته شد و سپس ترکیبات مورد نیاز مطابق با دستورالعمل‌های بالا به آن اضافه گردید سپس حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد و محلول به حجم رسیده به شیشه در آبی یک لیتری انتقال داده شد. pH محلول با استفاده از KOH یک نرمال به ۵/۸ رسانده شد و در آخرین مرحله ۷ گرم فیتو آگار اضافه شد و پس از بستن درب شیشه، محیط کشت آماده برای استریل شدن داخل اتوکلاو قرار داده شد. زمان لازم برای استریل کردن محیط کشت در اتوکلاو،۲۰ دقیقه در فشار ۱/۲ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد بود (پس از اینکه اتوکلاو به فشار و دمای لازم رسید، محیط‌ها ۲۰ دقیقه داخل این فشار و دما ماندند تا استریل شدند). پس از انجام عمل استریل ظروف حاوی محیط کشت به شرایط استریل، زیر هود لامینار منتقل شدند تا بعد از کم شدن دمای محیط کشت، داخل ظروف پتری استریل توزیع شوند. در هر ظرف پتری (با قطر ۹ میلی‌متر) حدود ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. بعد از جامد شدن محیط‌ها، پتری‌ها برای کشت ریزنمونه‌ها در شرایط استریل نگهداری شدند.

جدول۲-۱: دستورالعمل ساخت یک لیتر محیط کشت MS و MT

ترکیبات	غلظت در استوک	MS (میلی‌گرم)	MT (میلی‌گرم)
KNO_3	۱۰×	۱۹۰۰	۱۹۰۰
NH_4NO_3	۱۰×	۱۶۵۰	۱۶۵۰
$CaCL_2$	۱۰×	۴۴۰	۴۴۰
$MgSO_4$	۱۰×	۳۷۰	۳۷۰
KH_2PO_4	۱۰×	۱۷۰	۱۷۰
$MnSO_4.7H_2O$	۱۰۰×	۲۲/۳	۲۲/۳
$ZnSO_4.7H_2O$	۱۰۰×	۸/۶	۸/۶
H_3BO3	۱۰۰×	۶/۲	۶/۲
KI	۱۰۰×	۰/۸۳	۰/۸۳
$NaMoO_4.2H_2O$	۱۰۰×	۰/۲۵	۰/۲۵
$CuSO_4.5H_2O$	۱۰۰×	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
$COCl_3.6H_2O$	۱۰۰×	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
Na_2EDTA	۱۰×		۳۷/۳
$FeSO_4.7H_2O$	۱۰×		۲۷/۷
میواینوزیتول	۱۰×	۱۰۰	۱۰۰
گلیسین	۱۰×	۲	۲
تیامین	۱۰×	۱۰	۱
پیریدوکسین	۱۰×	۱۰	۱
اسیدنیکوتینیک	۱۰×	۵	۲
فولیک اسید	۱۰×	۰/۵	-
بیوتین	۱۰×	۰/۰۵	
ساکاروز		۳۰ گرم	۵۰ گرم

۲-۲-۲- آماده سازی لامینار ایرفلو[۳۳]، ضدعفونی بذور و تهیه ریزنمونه

قبل از استفاده از لامینار باید آن را آماده ساخت. بدین صورت که ابتدا سطح داخلی لامینار با پنبه آغشته به الکل تمیز شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه تحت تابش نور UV قرار گرفت. کلیه ظروف مورد استفاده برای کشت یا ضد عفونی بذرها قبلا در آون یا اتوکلاو استریل گردیدند.

قبل از روشن کردن لامپ UV می‌توان کلیه ظروف را زیر آن قرار داد. بعد از خاموش شدن لامپ UV و پیش از باز کردن درب هود و شروع به کار، فن دستگاه به مدت ۱۰ دقیقه روشن می‌گردد این عمل مانع از پخش شدن رادیکال‌های آزاد سمی اکسیژن در اتاق رشد می‌گردد.

آزمایش اول: ابتدا شاخه‌های بریده شده از نهال‌های ۸-۱۲ ماهه لایم و لیمو خارکی را به قطعاتی که دارای حداقل ۱ گره و فاقد گره (میان گره) باشند تقسیم کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در معرض آب جاری قرار داده شد. سپس، ریزنمونه‌ها به ظرف محتوی آب و مایع ظرفشوئی حاوی چند قطره توئین۴۰ انتقال داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در ادامه، ریزنمونه‌ها ۳ مرتبه با آب دو بار تقطیر استریل آبکشی شد و در زیر هود لامینار ریزنمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفت و ۲ مرتبه با آب دو بار تقطیر استریل شستشو داده شد در مرحله‌ی بعد ضدعفونی ریزنمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت۱۵ دقیقه قرارگرفت و در انتها سه مرتبه با آب دو بار تقطیر استریل شستشو داده شد.

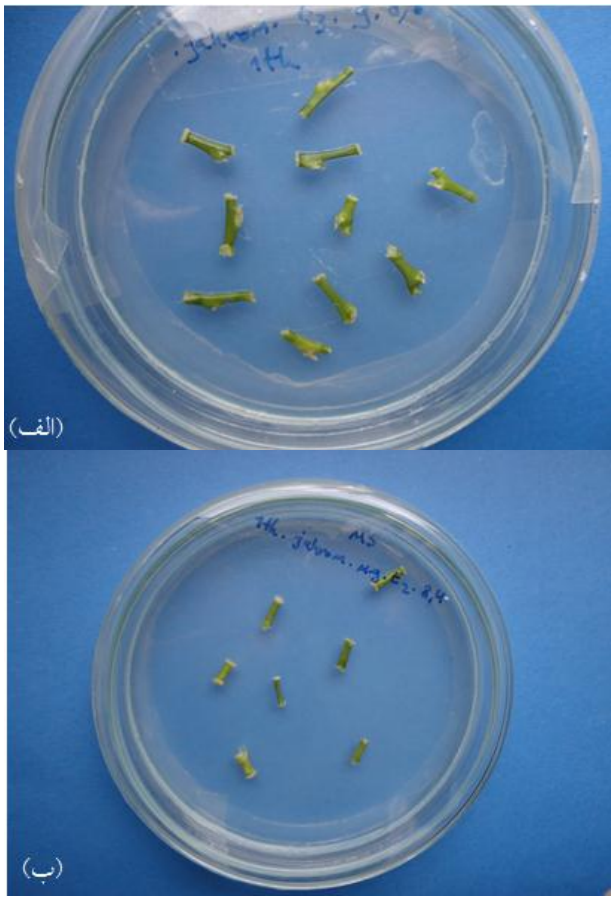
۳ روز بعد از کشت ریزنمونه‌ها، در محیط کشت القا کالوس‌زائی آلودگی باکتریایی مشاهده شد. به منظور کنترل آلودگی باکتریایی از محلول ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به مدت ۳۰ ثانیه استفاده شد. ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و بر روی کاغذ صافی استریل قرار گرفتند (تا علاوه بر خشک شدن سطح ریزنمونه‌ها، دو انتهای ریزنمونه‌ها برش داده شود). در نهایت ریزنمونه‌های گره و میان گره بر روی محیط کشت قرار داده شدند (شکل۲-۲ الف و ب).

33- Laminar air flow

آزمایش دوم و سوم: بذور لایم ژنوتیپ جهرم و بذور لیمو خارکی در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای حفظ قدرت جوانه زنی نگهداری شدند. تمام مراحل استریل کردن بذر زیر هود لامینار صورت گرفت. بذرها به مدت ۲ دقیقه در لیوان استریل حاوی الکل ۷۰ درصد قرار داده شد و سپس با استفاده از سمپلر الکل از لیوان خارج شد و ۳ مرتبه با آب دو بار تقطیر استریل شستشو داده شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در لیوان استریل حاوی هیپوکلریت سدیم ۷۰ درصد قرار داده شد و سپس ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد (در مراحل شستشو و قرار گرفتن بذرها در هیپوکلریت سدیم باید دقت زیادی به کار برد طولانی شدن زمان ماندن بذرها در هیپوکلریت سدیم و عدم آبکشی مناسب مانع از جوانه زنی بذر و یا تاخیر در جوانه زنی بذر می‌گردد). پس از مراحل استریل کردن بذرها، پوست بذرها با استفاده از دو پنس کاملا استریل جدا شد و بذرهای پوست گرفته شده با پنس استریل به لیوان‌های شیشه‌ای استریل حاوی محیط کشت MS بدون هورمون انتقال داده شدند. سپس درب لیوان‌ها با پلاستیک ضخیم استریل و پارافیلم پوشانده شد. لیوان‌ها با استفاده از فویل آلومینیومی پوشانده شدند (به منظور تامین تاریکی و جوانه زنی سریع‌تر بذور) و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت قرار داده شدند. به طور معمول ۲ هفته پس از کشت بذر، جوانه زنی در بذرها مشاهده شد (شکل۲-۳).

پس از جوانه زنی به مدت یک هفته تا ۱۰ روز بذرها در شرایط تاریکی نگهداری شده تا اپی‌کوتیل رشد بیشتری داشته باشد (شکل ۲-۴). انتقال سریع بذرهای جوانه زده به روشنائی تولید گیاهچه‌های کوتاه می‌کند که مناسب برای دریافت ریزنمونه اپی‌کوتیل و برگ لپه‌ای نمی‌باشد. ۳ هفته پس از جوانه زنی بذرها، لیوان‌های حاوی گیاهچه‌ها به روشنائی انتقال یافت (۱۲ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی). ریزنمونه‌ها ۳ تا ۴ هفته پس از قرارگیری گیاهچه‌ها در شرایط روشنائی دریافت شد. با استفاده از تیغ و پنس استریل در زیر هود لامینار اپی‌کوتیل‌ها به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم شده و در محیط کشت-های مختلف القا شاخه‌زائی و القا کالوس‌زائی قرار داده شد (شکل ۲-۵).

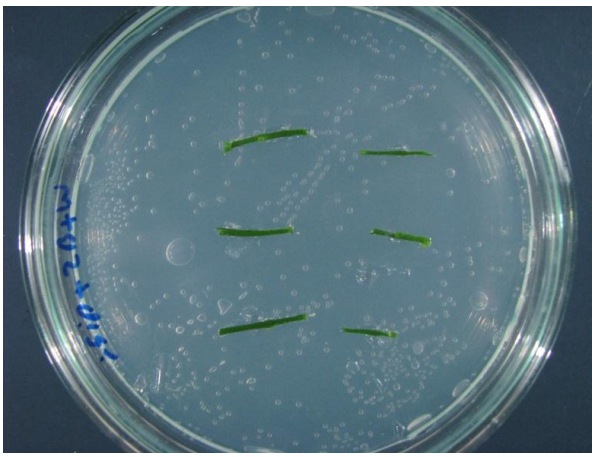
برگ لپه‌ای به نحوی که دمبرگ آن قطع نگردد با استفاده از پنس و تیغ برش داده شد و به نحوی که دمبرگ آن داخل محیط کشت قرار گیرد در محیط کشت قرار داده شدند (شکل ۲-۶). ریزنمونه‌های برگ، مانند برگ لپه‌ای به نحوی که دمبرگ آن قطع نگردد در محیط کشت القا شاخه زائی و کال‌زائی کشت شدند (شکل ۲-۷).



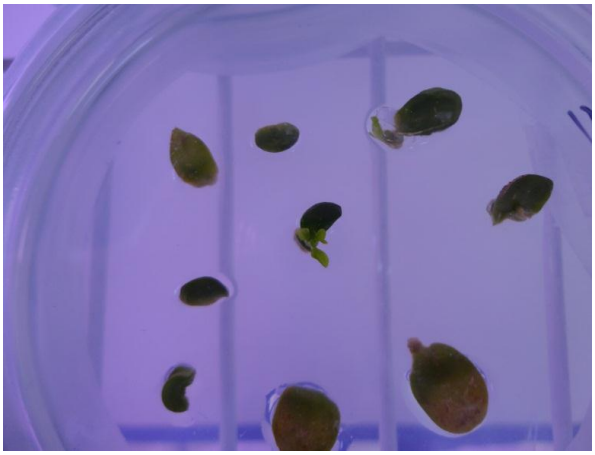
شکل۲-۲: ریزنمونه‌های گره (الف) و میان‌گره (ب) در محیط کشت MT

شکل ۲-۳: بذور کشت شده در محیط کشت MS (دو هفته پس از کشت)

شکل ۲-۴: گیاهچه‌های رشد یافته در شرایط تاریکی (یک هفته پس از جوانه زنی)



شکل ۲-۵: قطعات ۱ سانتی‌متری اپی‌کوتیل در محیط کشت القا شاخه‌زائی



شکل ۲-۶: ریزنمونه برگ لپه‌ای در محیط کشت القا شاخه‌زائی

شکل ۲-۷: ریزنمونه برگ در محیط کشت القا شاخه‌زائی

۲-۲-۳ شرایط نگهداری کشت‌ها

آزمایش اول: ریزنمونه‌های تهیه شده از نهال‌های ۸-۱۲ ماهه لایم و لیمو خارکی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D قرار داده شدند سپس پتری‌های حاوی ریزنمونه توسط فویل آلومینیومی پوشانده شدند و در دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از نظر شرایط محیطی مکان نگهداری کشت‌ها باید کنترل شده باشد و احتمال ایجاد تنش به ریزنمونه‌های کشت شده وجود نداشته باشد.

آزمایش دوم: همان طور که ذکر گردید ۸ هفته پس از کشت بذرهای لایم و لیمو خارکی، ریزنمونه اپی-کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای تهیه شد و در ۱۴ محیط کشت القا کالوس‌زائی با غلظت هورمونی متفاوت از هورمون‌های کینتین، NAA، 2,4-D و 2ip قرارداده شدند. پتری‌های حاوی ریزنمونه با فویل آلومینیومی پوشانده شدند و در دمای ۲ ± ۲۴ سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند.

۱ میلی‌گرم در لیتر2,4-D
۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۸ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۱۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۲ میلی‌گرم در لیتر2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک استیک اسید (NAA)
۴ میلی‌گرم در لیتر NAA
۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۲ میلی گرم در لیتر 2ip

۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip

بر اساس برنامه، بعد از انگیزش کالوس از ریزنمونه‌های ذکر شده در دو مسیر برای آزمایش دوم در نظر گرفته شد ۱- انتقال کالوس‌های پیش جنینی به محیط کشت تولید جنین سوماتیکی ۲- باززائی غیر مستقیم (کالوس را وارد فاز شاخه‌زائی و سپس ریشه‌زائی نمودن).

پس از القا کالوس، کالوس‌ها به محیط کشت رشد کالوس و هم‌چنین محیط کشت تولید جنین سوماتیکی انتقال داده شدند. با کاهش غلظت هورمونی به نصف میزان اولیه در هر تیمار برای رشد کالوس و تیمارهای دیگری شامل ۱/۵میلی‌گرم در لیتر کینتین، ۱/۲ MS (بدون هورمون)، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D با ۲ میلی‌گرم در لیترکینتین، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4- D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP انتقال داده شدند. کالوس‌های ۲، ۴، ۶ هفته‌ای در محیط کشت‌های که در بالا ذکر گردید در شرایط تاریکی و نیمه تاریکی(برای القا جنین) قرار داده شدند و تعدادی از کالوس‌ها به منظور شاخه‌زائی در ۱۹ محیط کشت با غلظت‌های متفاوتی از هورمون BAP, 2,4-D, IBA, NAA و کینتین قرار داده شدند. پتری‌ها در دمای درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ثابت در اتاق کشت نگهداری شدند.

۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۵٪ ساکاروز
۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۱ میلی‌گرم در لیتر IBA + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین
۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر NAA + ۵٪ ساکاروز
۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D
۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IBA

۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر IBA

۲ میلی‌گرم در لیترBAP + ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

۲ میلی‌گرم در لیترBAP + ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر NAA

۲ میلی‌گرم در لیترBAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

۲ میلی‌گرم در لیترBAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA

۳ میلی‌گرم در لیترBAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

۱ میلی‌گرم در لیترBAP + ۱میلی‌گرم در لیتر NAA

۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

MS بدون هورمون

MS ۱/۲ و MT ۱/۲

آزمایش سوم: در این آزمایش نیز مانند آزمایش دوم از گیاهچه‌های ۸ هفته‌ای لایم رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای تهیه شد. ریزنمونه‌ها در ۱۲ محیط کشت القا شاخه‌زائی مستقیم با غلظت هورمونی متفاوت از هورمون‌های زئاتین، کینتین، بنزیل آمینو پورین و نفتالیک استیک اسید قرار داده شدند. ریزنمونه‌ها در شرایط ۱۶ ساعت روشنائی و دمای۲ ± ۲۴درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند.

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر زئاتین

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر زئاتین

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۳ میلی‌گرم در لیتر زئاتین

۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر زئاتین

۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۲ میلی‌گرم در لیتر زئاتین

۱ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۳ میلی‌گرم در لیتر زئاتین

۱ میلی‌گرم در لیترBAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۱ میلی‌گرم در لیترNAA

۲ میلی‌گرم در لیترBAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۱ میلی‌گرم در لیترNAA

۳ میلی‌گرم در لیترBAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین + ۱ میلی‌گرم در لیترNAA

۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2ip + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA
۲ میلی‌گرم در لیتر 2ip + ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP + ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA

پس از شاخه‌زائی شاخساره‌ها به محیط کشت‌هایی با غلظت متفاوت از هورمون NAA انتقال داده شدند. ۳ هفته پس از رشد شاخساره‌ها در محیط کشت شاخه‌زائی شاخساره‌ها به محیط کشت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA انتقال داده شدند. شاخساره‌ها در لیوان‌های حاوی محیط کشت ریشه‌زائی۲ ± ۲۴ سانتی‌گراد در شرایط ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنائی نگهداری شدند. برای تسریع ریشه‌زائی زیر لیوان‌های محیط کشت کیسه‌های پلاستیکی سیاه رنگ پهن گردید.

فصل سوم

نتایج و بحث

در این فصل به بررسی داده‌های بدست آمده در این تحقیق پرداخته شده است.

در بررسی نتایج تجزیه واریانس آزمایش اول، اثر ژنوتیپ و محیط کشت بر درصد کال‌زائی معنی‌دار شد. مقایسات میانگین اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ را بیان می‌دارد. مناسب‌ترین پاسخ به درصد کال‌زائی در ژنوتیپ‌های لایم و در محیط کشت MS نشان داده شد.

در آزمایش دوم داده‌برداری به منظور بررسی درصد کال‌زائی، نوع بافت کالوس و سایز کالوس انجام شد. جدول تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، هورمون و ریزنمونه بر در صد کال‌زائی را معنی‌دار نشان داد. دو ژنوتیپ لایم نسبت به لیمو خارکی کال‌زائی مناسب‌تری نشان دادند. بیشترین میزان کال‌زائی در ریزنمونه اپی-کوتیل و در تیمار هورمونی ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد. همان طور که در فصل قبل ذکر شد نوع بافت کالوس بر در صد باززائی و جنین‌زائی موثر است. در بررسی نوع بافت کالوس در این تحقیق دو نوع بافت فشرده و پودری مشاهده شد. حداکثر کال‌زائی فشرده در ریزنمونه اپی‌کوتیل مشاهده شد. بررسی نتایج حاصل از مقایسات میانگین نشان می‌دهد که حداکثر رشد کالوس در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ لپه‌ای مشاهده گردید. کالوس‌های بدست آمده از ژنوتیپ‌های لایم نسبت به لیمو خارکی رشد بیشتری نشان دادند.

مقایسات میانگین در آزمایش سوم اثر معنی‌دار هورمون و ریزنمونه را بر درصد شاخه‌زائی نشان می‌دهد. در تیمار هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر زئاتین با یک میلی‌گرم در لیتر BAP حداکثر شاخه‌زائی را نشان داد. ریزنمونه اپی‌کوتیل و برگ درصد شاخه‌زائی بیشتری را نشان دادند.

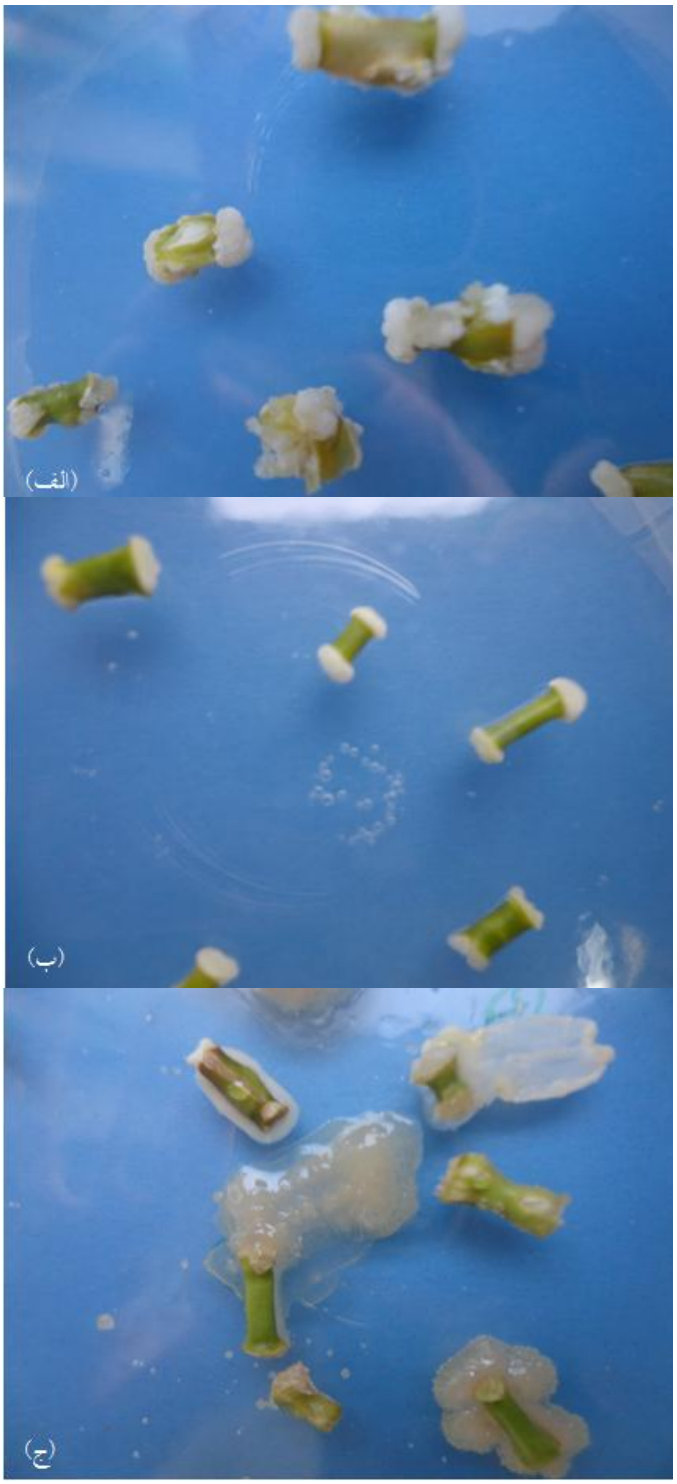
۳-۱ آزمایش اول: بررسی اثر ژنوتیپ و محیط کشت بر درصد کال‌زایی کالوس‌های بدست آمده از کشت ریزنمونه گره و میان‌گره.

سه هفته پس از کشت ریزنمونه‌های گره و میان گره داده‌برداری درصد کال‌زایی انجام شد و پنج هفته پس از کشت داده‌برداری نهائی انجام شد. ریزنمونه‌های گره و میان‌گره لایم ژنوتیپ هرمزگان و جهرم و لیمو خارکی به تقریب همزمان با یکدیگر شروع به رشد نمودند. در داده‌برداری اول پنجاه درصد ریزنمونه‌ها کال‌زایی نشان دادند و در بررسی مجددی حداکثر کال‌زائی مشاهده شد. برخی از ریزنمونه-هایی که کال‌زایی از خود نشان ندادند قهوه‌ای شدند و نهایتاً از بین رفتند. در حالی‌که ریزنمونه‌هایی که کال‌زایی از خود نشان دادند سبز رنگ بوده و از زمان کشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت تغییر رنگی در این ریزنمونه‌ها مشاهده نگردید (شکل ۳-۱ الف و ب).

کالوس‌های سفید رنگ و فشرده همراه با ریزنمونه‌ها به مدت سه هفته در محیط کشت MS و MT نگهداری شدند. هشت هفته پس از کشت آلودگی درونی باکتریایی در ریزنمونه‌ها مشاهده گردید و ادامه کار با ریزنمونه‌های حاصل از بذر انجام شد(شکل ۳-۱ ج).

نتایج تجزیه واریانس داده‌برداری از درصد کال‌زایی نشان داد که فاکتورهای ژنوتیپ و محیط کشت اثر معنی‌دار بر درصد کال‌زائی داشته است (جدول ۳-۱).

نتایج نشان داد محیط کشتMS نسبت به محیط کشت MT بر درصد کال‌زائی موثرتر است (شکل ۳-۲). زانگ (۲۰۰۶) اثر مطلوبی از کال‌زایی محیط کشت MT در کالوس‌زایی پیش‌جنینی در ۲۰ گونه از مرکبات گزارش نموده است. تاکنون گزارشی مبنی بر کال‌زایی لایم و لیمو خارکی در محیط کشت MT ارائه نشده است.



شکل ۳-۱: کال‌زائی در محیط کشت MS ریزنمونه گره (الف) و میان گره (ب). آلودگی باکتریایی ریزنمونه میان گره (ج).

بعضی از ارقام مرکبات نسبت به محیط کشت MT واکنش مناسبی نشان داده‌اند. در عوض برخی مانند *C. reticulate* نسبت به محیط کشت MT پاسخ مناسبی نشان نمی‌دهند (گروسر، ۲۰۱۰).

دو ژنوتیپ لایم که در این تحقیق استفاده شد نسبت به لیمو خارکی واکنش مناسب‌تری نسبت به درصد کال‌زایی در محیط کشت MS و MT از خود نشان دادند (شکل ۳-۳) اثر ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی در بسیاری از مقالات گزارش شده است (ماگدالین، ۲۰۰۷، خان، ۲۰۰۹).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ بر درصد کال‌زائی معنی‌دار شد. با توجه به شکل ۳-۴ کمترین درصد کال‌زایی در لیمو خارکی و در محیط کشت MT مشاهده شد.

۳-۲- آزمایش دوم: بررسی اثر هورمون، ریزنمونه و ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی، اندازه کالوس و نوع بافت کالوس لایم (ژنوتیپ‌های جهرم و هرمزگان)

۳-۲-۱- بررسی اثر هورمون، ریزنمونه و ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی

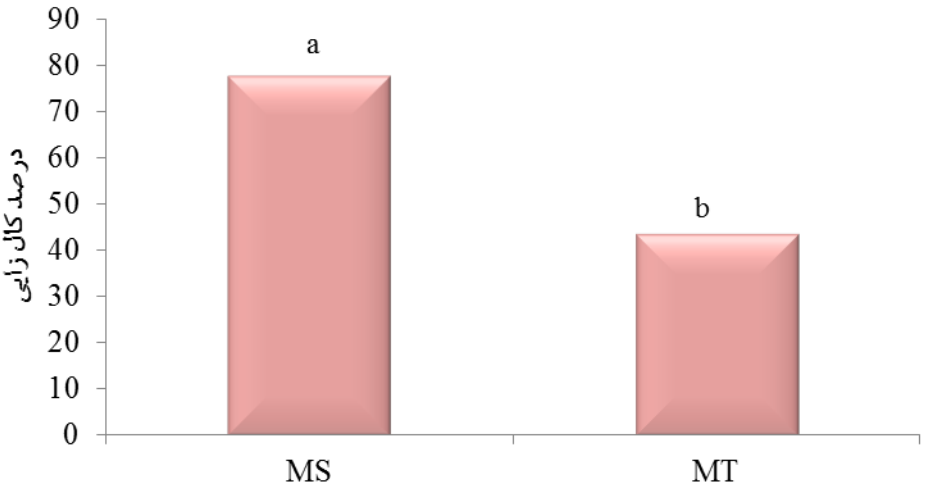
تیمار هورمونی (۱۳) برای بررسی میزان کال‌زایی در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ‌لپه‌ای در این آزمایش استفاده گردید. ریزنمونه‌هایی که در محیط کشت حاوی ۸ و ۱۶ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کشت شدند ۱۰ روز پس از کشت از بین رفتند (شکل ۳-۵ الف) به نظر می‌رسد سمیت ناشی از غلظت بالای 2,4-D منجر به از بین رفتن ریزنمونه‌ها شد.

تیمارهای هورمونی ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر نفتالیک اسید در ریزنمونه‌ها القاء ریشه‌دهی نمودند. دو هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، ریشه‌زایی مشاهده گردید (شکل ۳-۵ ب). کالوس‌زایی نشان دادند و بعضی از ریزنمونه‌ها، علاوه بر کالوس، ریشه‌زا نیز گردیدند. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ‌لپه‌ای در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شدند. برخی از ریزنمونه‌های کشت شده، سه هفته پس از کشت از آنجائی‌که کالوس‌ها می‌توانند وارد سه مسیر متفاوت گردند (شاخه‌زایی، ریشه‌زایی و جنین‌زایی).

جدول ۳-۱: تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، محیط کشت و نوع ریز نمونه بر درصد کالوس‌زایی (میان‌گره)

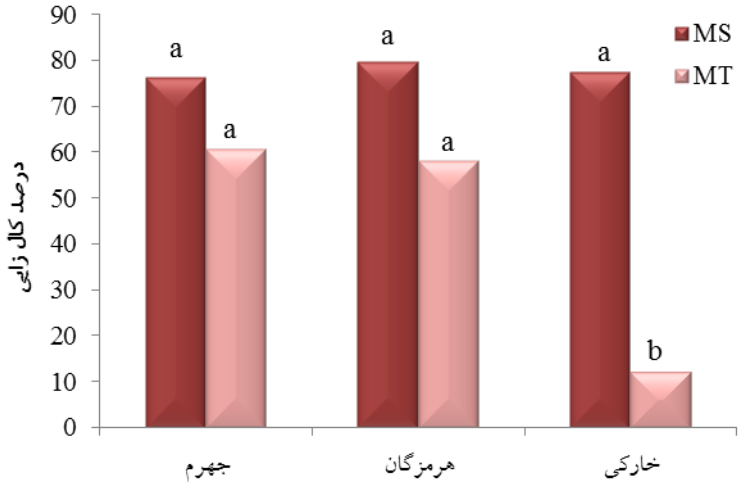
S.O.V	df	MS
محیط کشت	۱	**۴۴۴/۹۳
ژنوتیپ	۲	*۴۴۵/۲۸
ریزنمونه	۱	^{ns}۴۴۷/۱۷
محیط کشت × ژنوتیپ	۲	*۴۴۵/۱۰
محیط کشت × ریزنمونه	۱	^{ns}۴۴۴/۸۹
ریزنمونه × ژنوتیپ	۲	^{ns}۴۴۳/۱۰
محیط کشت × ریزنمونه × ژنوتیپ	۲	^{ns}۴۴۵/۵۵
خطا	۳۶	-

** معنی داری در سطح ۱٪، * معنی داری در سطح ۵٪ و ns عدم معنی داری.



شکل ۳-۲: اثر محیط کشت بر درصد کال‌زایی

شکل ۳-۳: اثر ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی



شکل ۳-۴: اثر متقابل محیط کشت و ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی

القاء کالوس به سمت ریشه‌دهی مانع از القاء کالوس به سمت شاخه‌زایی و جنین‌زایی می‌گردد. به عبارت دیگر اگر کالوس به سمت ریشه‌زایی برود هرگز باززا نخواهد شد. با توجه به دلایل فوق تیمارهای هورمونی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA حذف گردیدند (شکل ۳-۵ ج).

ریزنمونه‌هایی محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip کشت شده بودند سه هفته پس از کشت متورم شده و به نظر می‌رسید که در حال کالوس‌زایی هستند اما پنج هفته پس از کشت، تغییر دیگری در ریزنمونه‌ها مشاهده نگردید. ریزنمونه‌های کشت شده در پنج تیمار هورمونی ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین تولید کالوس نمودند. کاربرد 2,4-D با غلظت‌های پائین، به تنهایی یا همراه با کینتین اثر مطلوبی بر کالوس‌زایی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ‌لپه‌ای نشان داد. دو هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، کال‌زایی مشاهده گردید البته میزان کالوس بسیار کم و با دقت بالا قابل مشاهده بود. ۴ هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، کالوس‌های سفیدرنگ و فشرده مشاهده شدند (شکل۳-۶ الف و ب). نتایج تجزیه واریانس داده‌برداری از درصد کال

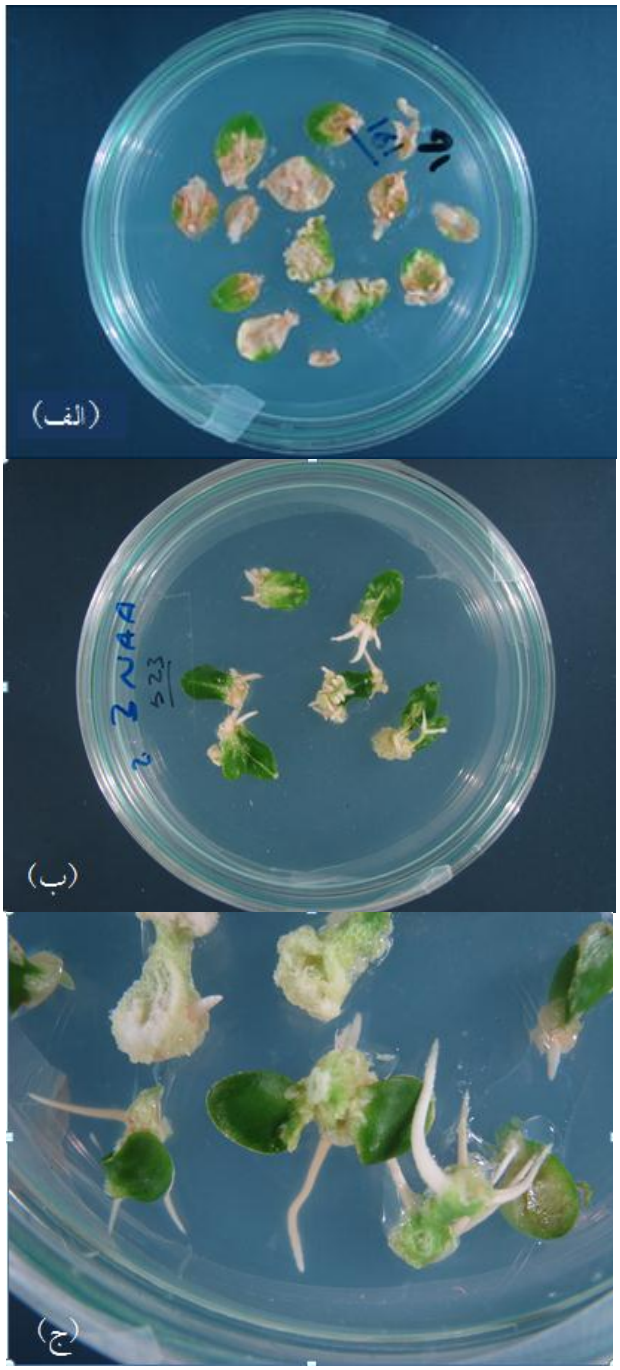
زایی یک ماه پس از کشت ریزنمونه‌ها نشان داد که فاکتورهای ژنوتیپ، ریزنمونه و هورمون اثر معنی‌داری بر درصد کال‌زائی داشته اند (جدول ۳-۲). بررسی مقایسات میانگین نشان می‌دهد که درصد کال‌زایی در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل بیش‌تر از ریزنمونه‌های برگ و برگ‌لپه‌ای است (شکل ۳-۷).

ریزنمونه اپی‌کوتیل در ارقام متفاوتی از مرکبات مناسب برای کال‌زایی و باززایی گزارش شده است (اندو و همکاران، ۲۰۰۵، راشد و همکاران، ۲۰۰۵) تاکنون کال‌زایی در ریزنمونه برگ‌لپه‌ای در مرکبات و لیموترش گزارش نشده است و نتایج نشان می‌دهد که درصد کال‌زائی ریزنمونه اپی‌کوتیل نسبت به برگ لپه‌ای بیش‌تر است اما ریزنمونه برگ‌لپه‌ای نیز مناسب برای کال‌زایی است به خصوص آنکه مدت زمان کمتری برای دریافت ریزنمونه نسبت به اپی‌کوتیل نیاز است.

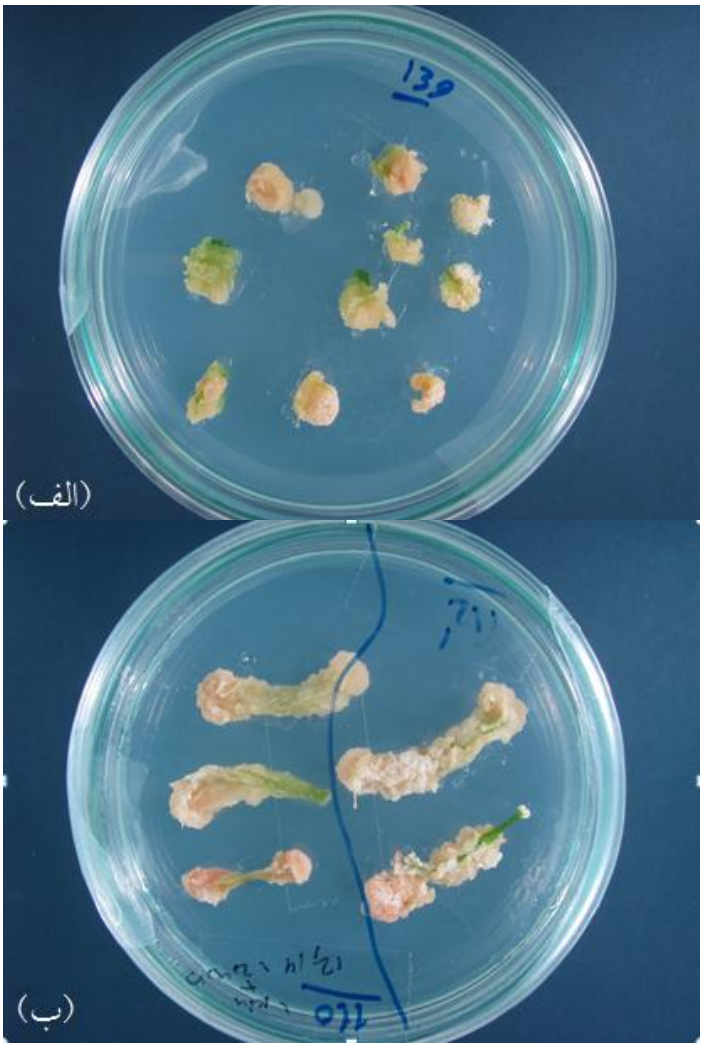
ریزنمونه‌های دو ژنوتیپ لایم (هرمزگان و جهرم) نسبت به لیمو خارکی درصد کال‌زایی بیش‌تری نشان دادند (شکل ۳-۸).

همان طورکه در آزمایش اول ذکر شد اثر ژنوتیپ در بسیاری از گونه‌های گیاهی و مرکبات بر درصد کال-زائی و باززائی گزارش شده است. در بین تیمارهای هورمونی به کار برده شده حداقل کال‌زایی در ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد که کاربرد همزمان 2,4-D و کینتین مناسب‌تر از کاربرد 2,4-D به تنهایی است. کاربرد ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه یک میلی‌گرم در لیترکینتین مطلوب‌ترین تیمار هورمونی بر درصد کال‌زایی است (شکل ۳-۹).

در مقالات غلظت ۲-۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D برای کال‌زایی در مرکبات گزارش شده است (اینست و همکاران، ۱۹۸۱، آگراوال و همکاران، ۱۹۹۳، پنا و همکاران، ۱۹۹۷، اندو و همکاران، ۲۰۰۵، ماگدالین و همکاران، ۲۰۰۷). در گزارشات کینتین در مرحله‌ی جنین‌زایی و باززایی مستقیم استفاده شده است و در کال‌زایی مرکبات استفاده نشده است (البحرانی، ۲۰۰۱، خان، ۲۰۰۹) و این اولین گزارش از کال‌زایی لیموترش با استفاده از کینتین است.



شکل ۳-۵ از بین رفتن ریزنمونه برگ در محیط کشت حاوی ۸ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D (الف)، ریشه دهی ریزنمونه برگ در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA (ب) کال‌زائی و ریشه دهی در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (ج).

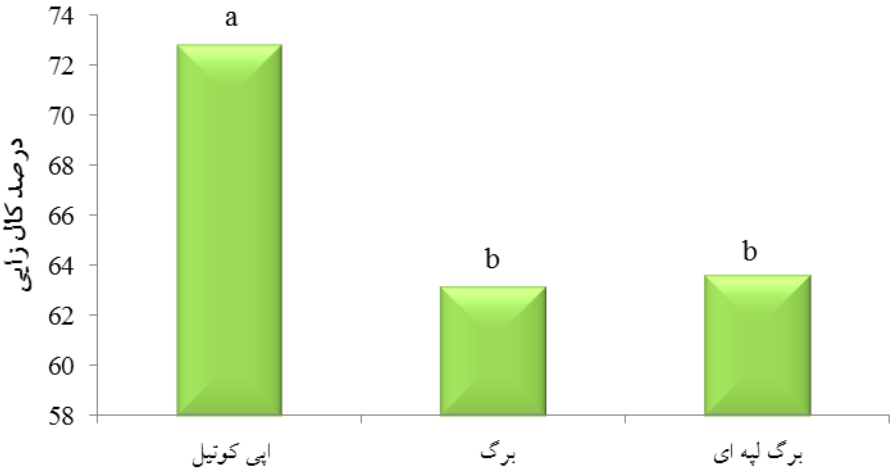


شکل ۳-۶: کال‌زائی ریزنمونه برگ لپه‌ای (الف) و اپی‌کوتیل (ب) در محیط کشت ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین با ۱ میلی-گرم در لیتر 2,4-D .

جدول ۳-۲: تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، هورمون و نوع ریز نمونه بر درصد کالوس‌زایی

S.O.V	df	MS
ژنوتیپ	۲	۲۶۶/۴۱**
هورمون	۴	۲۶۸۳/۵۳**
ریزنمونه	۲	۲۶۹/۲۷*
ریزنمونه × هورمون	۸	۲۶۹/۹۰ns
ژنوتیپ × ریزنمونه	۴	۲۷۱/۳۰ns
هورمون × ریزنمونه	۸	۲۶۹/۱۵**
ریزنمونه × هورمون × ژنوتیپ	۱۶	۲۷۰/۱۵ns
خطا	۱۱۸	-

** معنی داری در سطح ۱٪، * معنی داری در سطح ۵٪ و ns عدم معنی داری.



شکل ۳-۷: اثر نوع ریزنمونه بر درصد کال‌زایی

بررسی مقایسات میانگین اثر متقابل ریزنمونه و هورمون را نشان می‌دهد (شکل ۳-۱۰). ریزنمونه‌ی اپی-کوتیل در دو محیط کشت ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کنیتین حداکثر میزان کالوس‌زایی را نشان دادند. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ در محیط کشت حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین کالوس‌زایی مناسبی از خود نشان دادند. حداقل میزان درصد کال-زایی در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ در محیط کشت حاوی یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد.

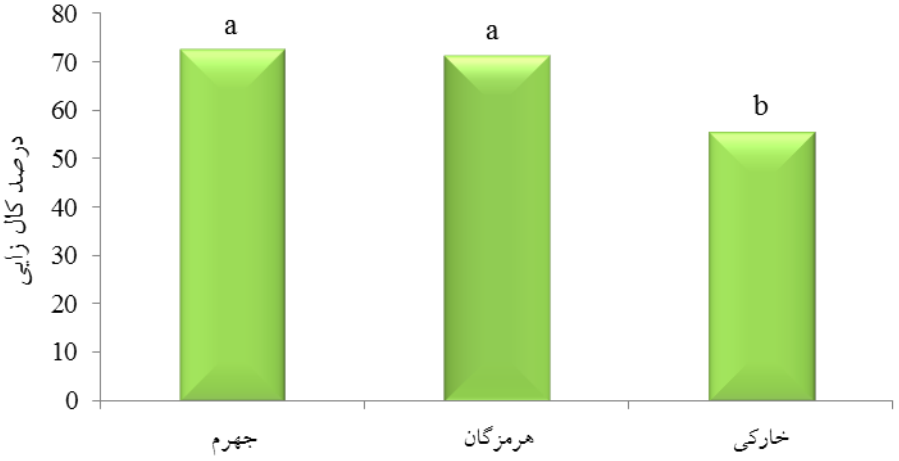
۳-۲-۲- بررسی اثر ریزنمونه بر نوع بافت کالوس

داده‌برداری نوع کالوس‌های ایجاد شده در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ‌لپه‌ای دو نوع کالوس فشرده و پودری را نشان می‌دهد (شکل ۳-۱۱ الف و ب) بخش عمده کالوس‌های تولید شده سفیدرنگ و فشرده هستند. این نوع کالوس‌ها مناسب برای باززایی و جنین‌زایی هستند. (جدول ۳-۳).

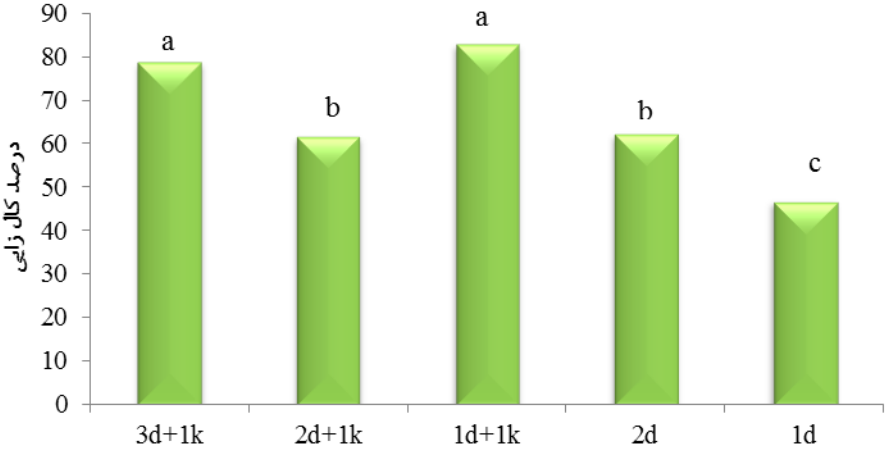
اثر معنی‌داری بر نوع بافت کالوس و ریزنمونه مشاهده شد. حداکثر میزان کالوس با بافت فشرده در ریزنمونه اپی‌کوتیل مشاهده شد و کمترین میزان کالوس با بافت فشرده در ریزنمونه برگ مشاهده شد.

۳-۲-۳- بررسی اثر هورمون، ریزنمونه و ژنوتیپ بر اندازه کالوس

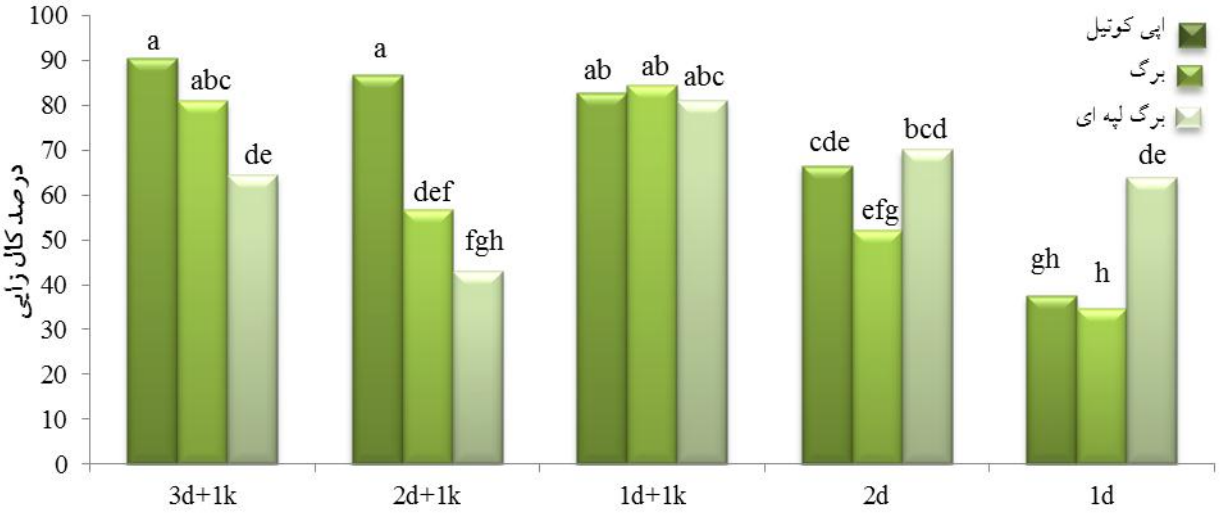
کالوس‌های ۲، ۴ و ۶ هفته‌ای به محیط کشت رشد کالوس انتقال داده شدند. در محیط کشت ۱/۵ میلی-گرم در لیتر کینتین و MS ۱/۲ رشد مناسبی مشاهده نشد. کاهش غلظت هورمونی محیط کشت‌های، القاء کالوس نیز اثر مطلوبی بر رشد کالوس نشان ندادند. از بین تیمارهای هورمونی به کار برده شده کالوس‌هایی که به محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر کینتین انتقال داده شدند رشد مناسب-تری از خود نشان دادند. کالوس‌های جدا شده از ریزنمونه اپی‌کوتیل و در محیط کشت ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (شکل، ۳-۱۲ الف و ب).



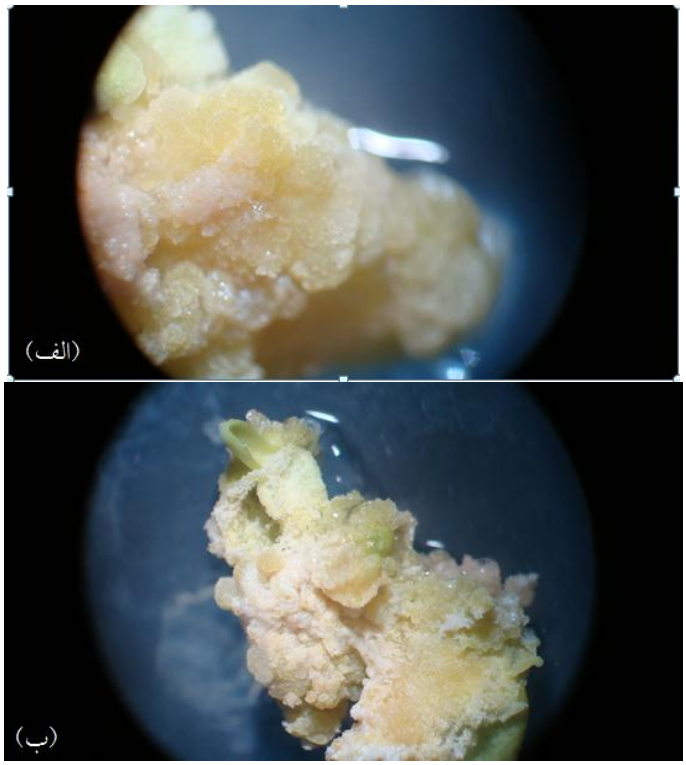
شکل ۳-۸: اثر ژنوتیپ بر درصد کال‌زایی



شکل۳-۹: اثر هورمون بر درصد کال‌زایی(d=2,4-D mg/l, K=kinetin mg/l)



شکل ۳-۱۰: اثر متقابل هورمون و نوع ریزنمونه بر درصد کال‌زایی(d=2,4-D mg/l, K=kinetin mg/l)



شکل ۳-۱۱: کالوس فشرده (الف) و پودری (ب).

بررسی مقایسات میانگین اثر معنی‌داری هورمون، ریزنمونه و ژنوتیپ را بر رشد کالوس نشان می‌دهد. حداکثر میزان رشد کالوس در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D مشاهده شد و حداقل میزان رشد کالوس در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین مشاهده شد (شکل ۳-۱۳).

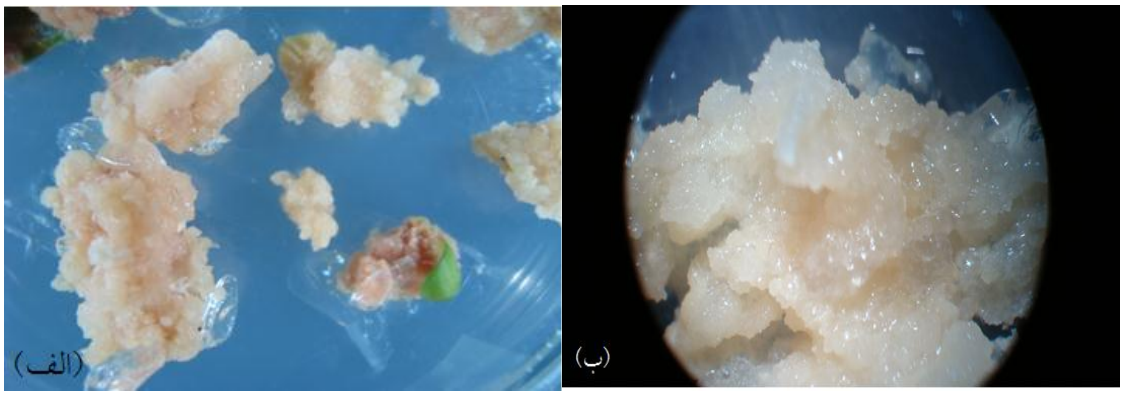
به نظر می‌رسد کاربرد غلظت بالای 2,4-D و هم‌چنین نبود هورمون سیتوکینین اثر منفی بر رشد کالوس لیموترش دارد. تعادل هورمونی که به سمت سیتوکینین باشد اثر مناسب‌تری بر رشد کالوس دارد. هورمون BAP به عنوان سیتوکینین همراه با اکسین که از قبل در کالوس‌ها وجود داشته است تعادل هورمونی مناسبی برای رشد کالوس‌ها نشان داد.

اثر معنی‌داری بین رشد کالوس و نوع ریزنمونه مشاهده شد (شکل ۳-۱۴) کالوس‌های جداشده از اپی-کوتیل حداکثر میزان رشد را در محیط کشت رشد کالوس نشان دادند. کمترین میزان رشد کالوس در کالوس‌های جداشده از برگ مشاهده شد. نکته مهم در نحوه‌ی قرار گرفتن ریزنمونه برگ و برگ‌لپه‌ای در محیط کشت القا کالوس و رشد کالوس است. قرار دادن برگ بدون دمبرگ و برگ‌لپه‌ای بدون دمبرگ لپه‌ای اثر بارزی بر القا کالوس دارد. برگ‌هایی که بدون دمبرگ در محیط کشت قرار گرفتند القا کالوس در آن‌ها ضعیف‌تر و در مرحله‌ی رشد کالوس کم رشدتر نشان داده شدند.

ژنوتیپ نیز بر رشد کالوس اثر معنی‌دار نشان داد. کالوس‌های ۲ ژنوتیپ لایم (جهرم و هرمزگان) نسبت به ژنوتیپ لیمو خارکی از رشد بهتری برخوردار بودند (شکل ۳-۱۵). بررسی مقایسات میانگین مبین اثر متقابل ریزنمونه و هورمون بر رشد کالوس است. ریزنمونه اپی‌کوتیل و برگ‌لپه‌ای در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین میزان رشد را نشان دادند و ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین حداقل میزان رشد را نشان دادند (شکل ۳-۱۶).

جدول۳-۳: مقادیر کالوس های تولیدی در ریزنمونه های مختلف(٪)

نوع کالوس	اپی‌کوتیل	برگ	برگ لپه‌ای
پودری	۰٪	۴۱/۸٪	۴۵/۸٪
فشرده	۱۰۰٪	۵۸/۲٪	۶۴/۲٪

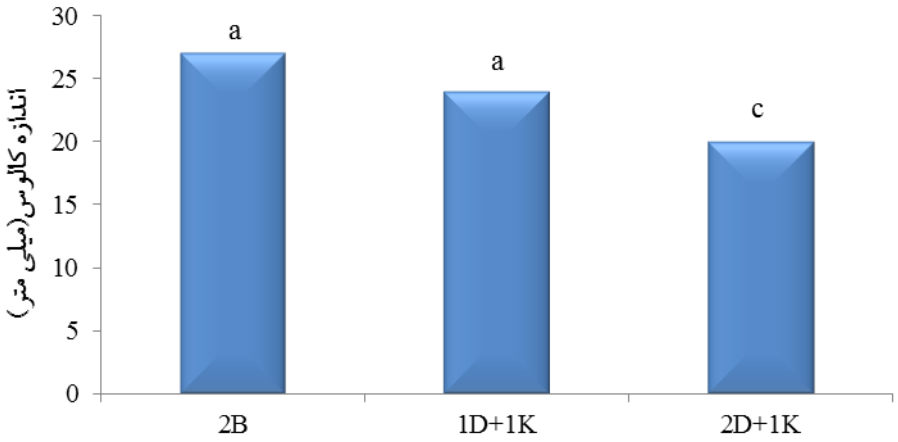


شکل ۳-۱۲: رشد کالوس در محیط حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP (الف) و ۱ میلی‌گرم در لیتر2,4-D با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین.

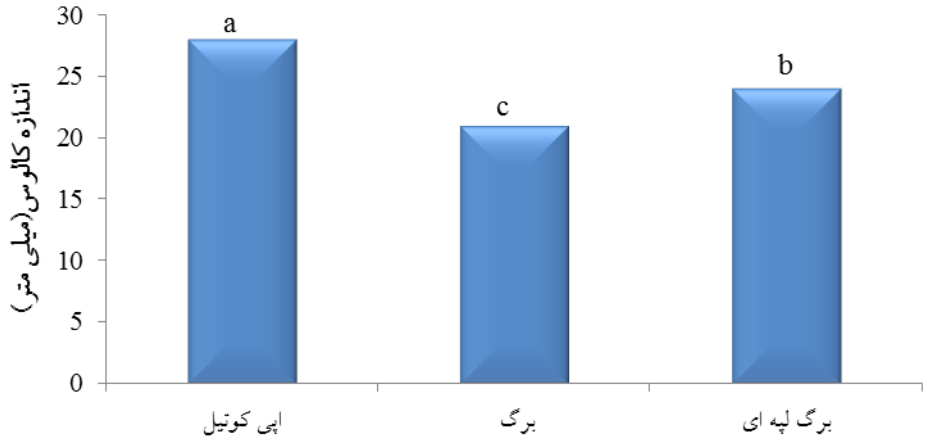
جدول ۳-۴: تجزیه واریانس اثر ژنوتیپ، محیط کشت و نوع ریزنمونه بر میزان رشد کالوس‌های تولید شده

S.O.V	df	MS
ژنوتیپ	۲	۷۶/۲۱*
هورمون	۲	۲۸۱/۴۲**
ریزنمونه	۲	۱۳/۶۹*
ژنوتیپ × هورمون	۴	۲۰۸۷/۳۳ns
ژنوتیپ × ریزنمونه	۴	۱۰۲/۲۰ ns
هورمون × ریزنمونه	۴	۷۰/۳۶*
ژنوتیپ × هورمون × ریزنمونه	۶	۲/۳۸ ns
خطا	۱۰۸	/۹۸۶

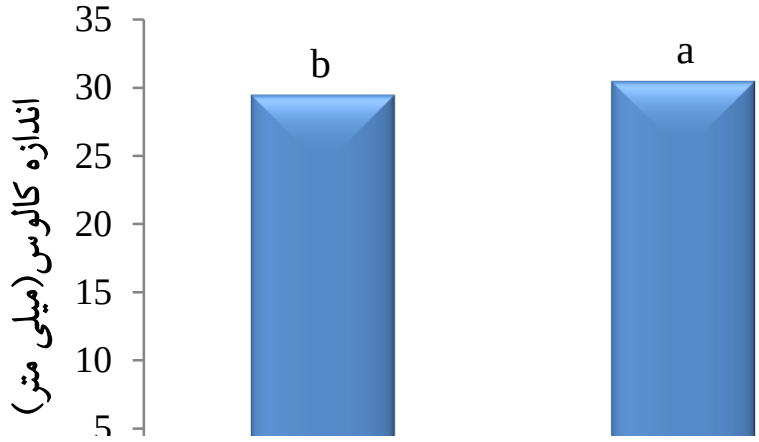
** معنی داری در سطح ۱٪، * معنی داری در سطح ۵٪ و ns عدم معنی داری.



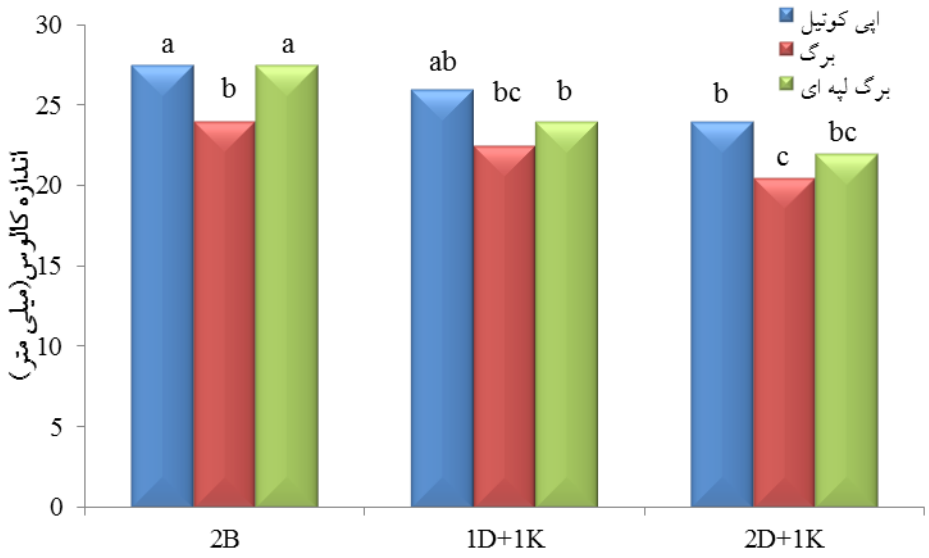
شکل ۳-۱۳: اثر هورمون بر اندازه کالوس (B= BAP, D= 2,4-D, K= kinetin)



شکل ۳-۱۴: اثر نوع ریزنمونه بر اندازه کالوس



شکل ۳-۱۵: اثر ژنوتیپ بر اندازه کالوس



شکل ۳-۱۶: اثر متقابل نوع ریزنمونه و هورمون بر اندازه کالوس(B= BAP mg/l, D= 2,4-D mg/l, K= kinetin mg/l).

۳-۲-۴- انتقال کالوس‌ها به محیط کشت جنین‌زائی و شاخه‌زائی

تعدادی از کالوس‌ها در شرایط روشنایی (شاخه‌زایی)، شرایط تاریکی (جنین‌زایی) و نیمه‌تاریکی (پوشاندن پلیت‌ها با روزنامه به منظور جنین‌زایی) قرار داده شدند. کالوس‌ها در مرحله‌ی ۲، ۴ و ۶ هفته‌ای به محیط کشت جنین‌زائی و باززایی انتقال داده شدند. یک هفته بعد از انتقال کالوس‌ها بـه محـیط کشـت جدیـد، هیچ‌گونه تغییری در کالوس‌ها مشاهده نشد.

هر ۲ هفته کالوس‌ها به محیط کشت تازه واکشت شدند اما ۸ هفته پس از کشت کالوس‌ها در ۱۹ محیط کشت جدید هیچ‌گونه تغییری در کالوس‌ها مشاهده نگردید و تنها تعدادی از کالوس‌هـا سـبزرنگ شـدند (شکل ۳-۱۷). کالوس‌های سبزرنگ به محیط کشت تازه انتقال داده شدند هیچ نوع تغییری ۳ هفته پس از واکشت کالوس‌های سبزرنگ مشاهده نشد.

جنین‌زایی در پرتقال با استفاده از یک و دو میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشـت MT گـزارش شـده است (دی‌دی، ۲۰۰۳). جنین‌زایی سوماتیکی در نارنج با استفاده از ۰/۲ میلی‌گرم در لیتـر 2,4-D و بـا ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP در محیط کشت MS گزارش شده است (اندو و همکـاران۲۰۰۵). جنـین‌زایـی در لیموترش در محیط کشت MS و با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین گزارش شد (راشد و همکاران، ۲۰۰۵). گزارش دیگری مبنی بر جنین‌زایی در لیموترش ارائه نشده اسـت. کـاربرد تیمارهـای هورمـونی فـوق بـر باززائی لایم و لیمو خارکی اثر مطلوبی نشان نداد. شاید تفاوت ژنوتیپی دلیلـی بـر عـدم کـارایی مناسـب تیمارهای هورمونی فوق باشد.

در بسیاری از گونه‌های گیاهی، انتقال کالوس پیش‌جنینی به محیط کشـت تولیـد جنـین مـی‌نمایـد. در بسیاری از ارقام مرکبات جنین‌زایی سوماتیکی گزارش شده است (گاویش و همکاران، ۱۹۹۱، کباسـون و

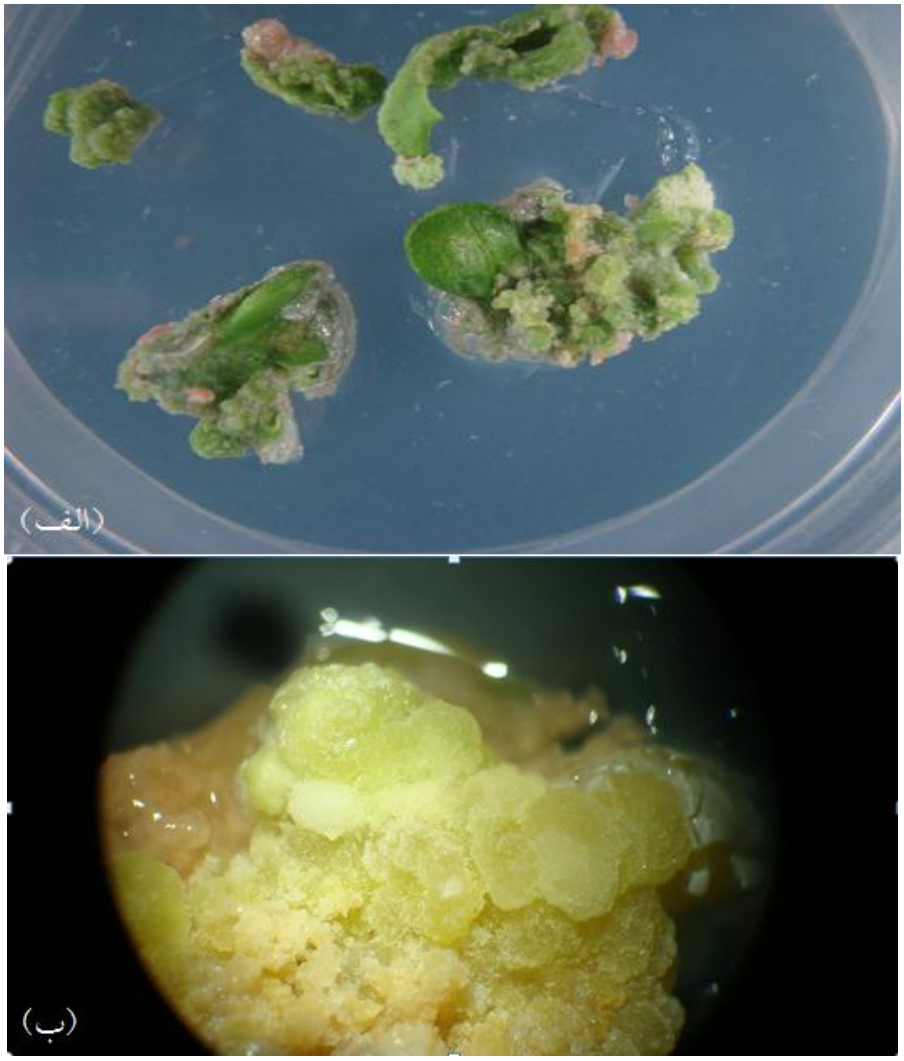
همکاران، ۱۹۹۵، دی‌دی، و همکاران، ۲۰۰۳، اندو و همکاران، ۲۰۰۵، زایو و همکاران، ۲۰۰۹) اما تاکنون گزارش معتبری مبنی بر جنین‌زایی سوماتیکی در لیموترش گزارش نشده است.

پس از انتقال ژن به مرکبات به ویژه در بعضی از ارقام مانند لیموترش، ریشه‌زایی گیاه باززا شده دشوار است. به همین دلیل توصیه محققین استفاده از روش باززایی غیرمستقیم (شاخه‌زایی از کالوس و جنین-زایی) در باززا کردن گیاه تراریخت است اما مروری بر گزارشات حاکی از این است که باززایی غیرمستقیم در انتقال ژن بسیار بیشتر از باززائی غیر مستقیم استفاده شده است (گوربل و همکاران، ۲۰۰۰، لویزا، ۲۰۰۷، گروسر، ۲۰۱۰) به نظر می‌رسد سخت باززا بودن و یا به عبارتی سرسخت بودن کالوس‌های لیموترش به باززایی سبب شده است که از این روش در باززایی لیموترش استفاده نگردد و روش ریزپیوندی جایگزین روش فوق گردد. در این روش گیاه تراریخت، باززا شده بر روی یک پایه‌ی جدید پیوند زده می‌شود در حالیکه در سایر ارقام مرکبات روش باززائی غیر مستقیم معمول شد (پنا و همکاران، ۱۹۹۷، خان و همکاران، ۲۰۰۹).

۳-۳- آزمایش سوم: باززائی مستقیم لایم (ژنوتیپ جهرم)

۳-۳-۱- بررسی اثر ریزنمونه و هورمون بر درصد باززایی لایم (ژنوتیپ جهرم)

سه هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها، ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل از دو بخش انتهایی متورم گشتند. در ریزنمونه‌های برگ و برگ‌لپه‌ای تغییری مشاهده نشد. تغییر رنگی در ریزنمونه‌ها در سه هفته فوق مشاهده نگردید. ریزنمونه‌ها سه هفته یکبار واکشت شدند. شش هفته پس از کشت اولین داده‌برداری انجام شد. در تعدادی از ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ‌لپه‌ای شاخه‌زایی مشاهده گردید (شکل ۳-۱۸ الف، ب و ج) در حالیکه بعضی از ریزنمونه‌ها دچار تغییر رنگ شدند (رنگ سبز ریزنمونه‌ها کم‌رنگ‌تر شدند). ۹ هفته پس از کشت داده‌برداری مجدد از درصد شاخه‌زایی و تعداد شاخه‌ها صورت پذیرفت(شکل ۳-۱۸ د، ض و ه). ریزنمونه‌هایی که کم‌رنگ شده بودند، قهوه‌ای شدند و از بین رفتند. شاخساره‌های



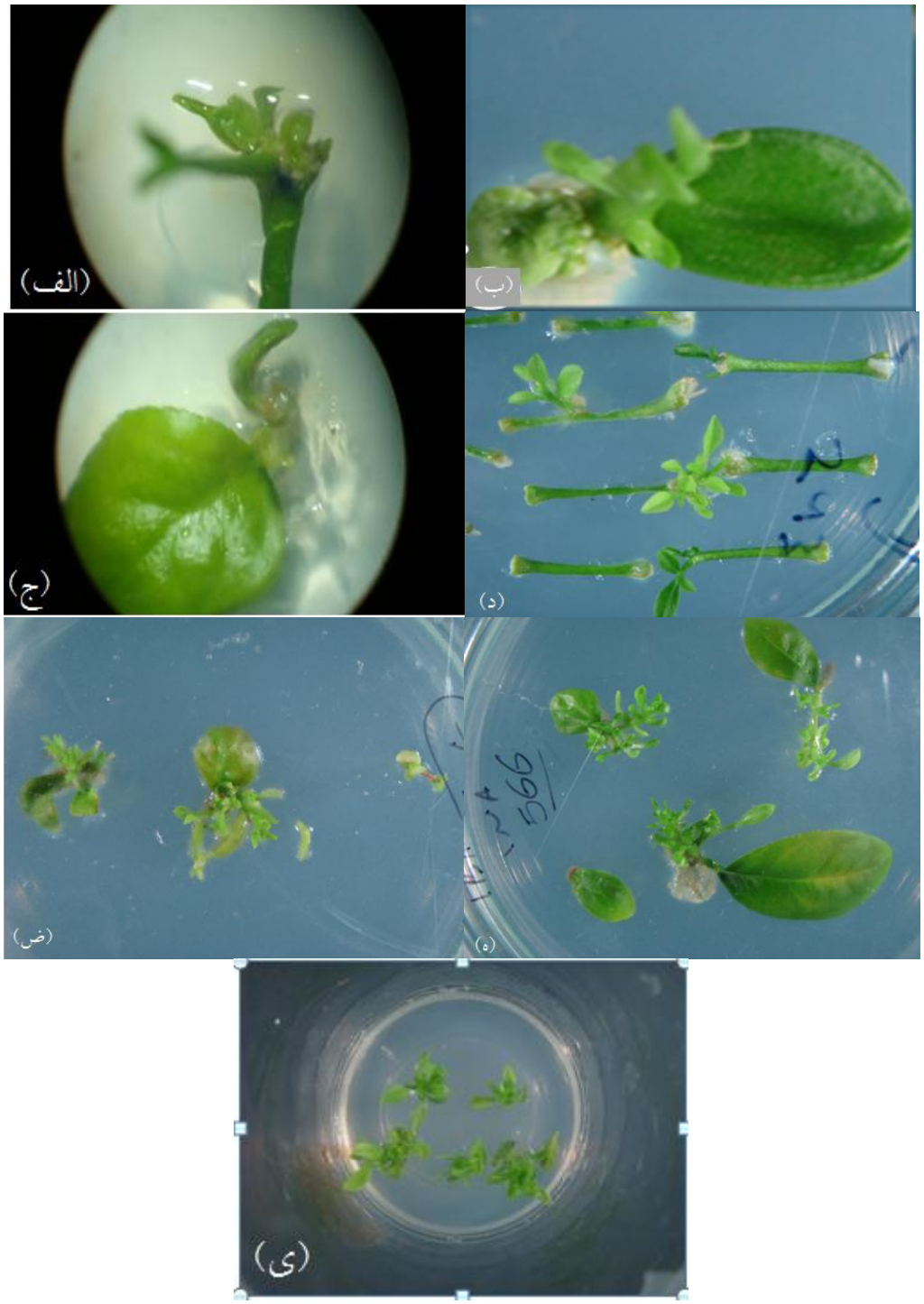
شکل۳-۱۷: سبز شدن کالوس ۴ هفته پس از انتقال به محیط کشت باززائی (الف) و ۸ هفته پس از انتقال (ب).

باقیمانده به محیط کشت ریشه‌زایی انتقال داده شدند (شکل ۳-۱۸ ی). بررسی نتایج تجزیه واریانس حاکی از معنی‌داری اثر هورمون و نوع ریزنمونه بر در صد شاخه‌زائی است (جدول ۳-۵). از ۱۲ محیط کشت با غلظت هورمونی مختلف به کار برده شده بیش‌ترین درصد شاخه‌زایی در محیط کشت یک میلی-گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر زئاتین مشاهده شد. محیط کشت‌های حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر زئاتین، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP با ۲ میلی‌گرم در لیتر زئاتین، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و یک میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و یک میلی‌گرم در لیتر NAA در رتبه دوم قرار گرفتند. حداقل میزان درصد باززایی در محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر زئاتین با یک میلی‌گرم در لیتر BAP مشاهده شد (شکل ۳-۱۹).

اثر معنی‌داری بین نوع ریزنمونه مورد استفاده و درصد شاخه‌زایی مشاهده شد. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ حداکثر درصد باززایی را نشان دادند. و ریزنمونه برگ‌لپه‌ای نسبت به ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ درصد باززایی کمتری از خود نشان دادند (شکل ۳-۲۰).

۳-۳-۲- بررسی اثر ریزنمونه و هورمون بر تعداد شاخه‌زائی لایم (ژنوتیپ جهرم)

بررسی نتایج تجزیه واریانس تعداد شاخه‌زایی، معنی‌داری اثر نوع ریزنمونه بر تعداد شاخه‌زائی را نشان داد. (جدول، ۳-۶) ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ تعداد شاخساره بیشتری تولید نمودند و ریزنمونه‌های برگ-لپه‌ای تعداد شاخساره کمتری ایجاد نمودند (شکل ۳-۲۱). از غلظت‌های متفاوتی از BAP در باززایی مرکبات استفاده شده است و مناسب‌ترین غلظت در باززائی مرکبات ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر بیان شده است (پنا و همکاران، ۱۹۹۷، ماگدالین و همکاران، ۲۰۰۷، بالستر و همکاران، ۲۰۰۸، لوئیزا و همکاران، ۲۰۰۹ و یانگ و همکاران، ۲۰۱۱).

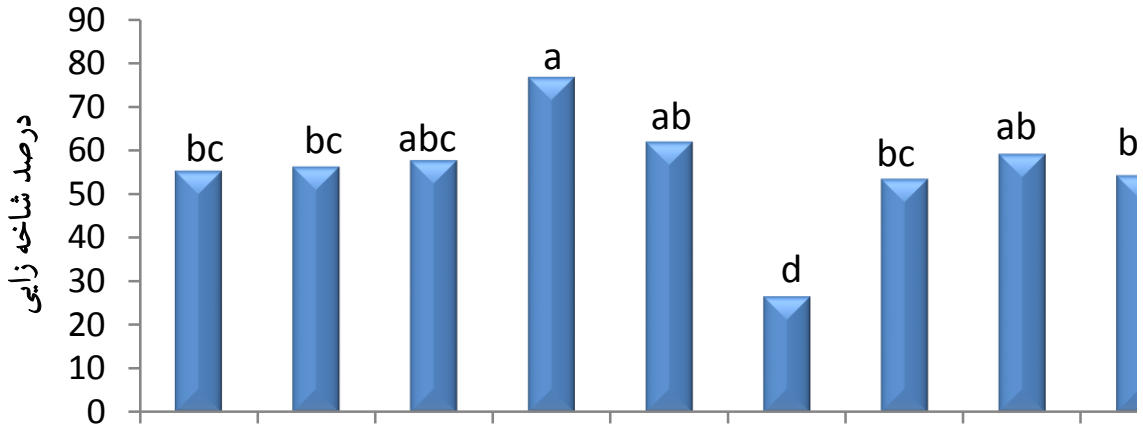


شکل ۳-۱۸: شاخه‌زائی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل پنج هفته پس از کشت (الف)، برگ لپه‌ای (ب) و برگ (ج) انتقال شاخه‌های باززا به محیط کشت ریشه‌زائی ۹ هفته پس از کشت (ی).

جدول ۳-۵: تجزیه واریانس اثر هورمون و نوع ریز نمونه بر درصد شاخه‌زائی

S.O.V	df	MS
هورمون	۱۱	۴۵۷/۷۷*
ریزنمونه	۲	۴۵۷/۸۰*
هورمون × ریزنمونه	۲۲	۴۵۷/۲۳ns
خطا	۷۲	-

* معنی داری در سطح ۵٪، ns عدم معنی داری.



شکل ۳-۱۹: اثر هورمون بر درصد شاخه‌زایی (B=BAP, Z= zeatin, K= kinetin, I= 2ip, N= NAA).

البحرانی (۲۰۰۱) از BAP، NAA و کینتین در باززایی لیموترش استفاده نمود وی مناسب‌ترین محیط کشت شاخه‌زایی لیموترش را ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر کینتین و یک میلی‌گرم در لیتر NAA معرفی نمود. محیط کشتی که البحرانی معرفی نمود میزان شاخه‌زایی کمتری نسبت به

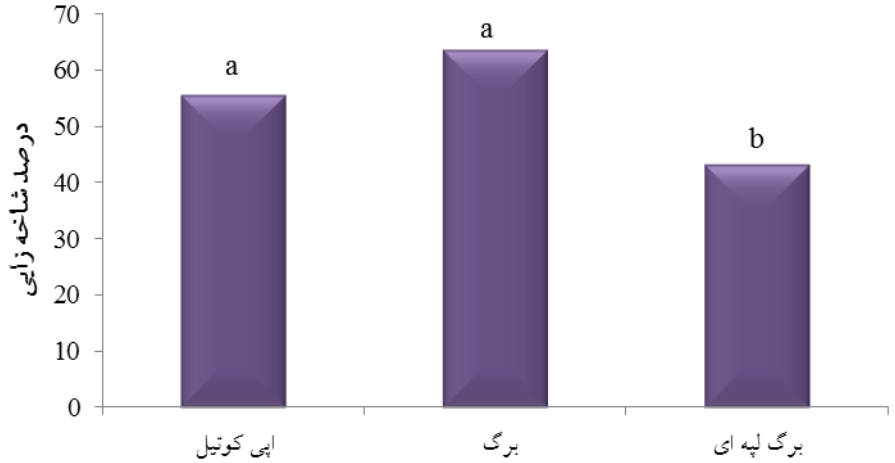
تیمار هورمونی زئاتین به کاربرده در این تحقیق از خود نشان داد. تاکنون گزارش مبنی بر استفاده از هورمون زئاتین و 2ip در شاخه‌زایی مرکبات ارائه نشده است. در حالیکه مناسب‌ترین محیط کشت در این تحقیق استفاده از هورمون زئاتین همراه با غلظت‌های پائین BAP است.

در بسیاری از ارقام مرکبات از ریزنمونه اپی‌کوتیل برای باززایی استفاده شده است (بالستر و همکاران، ۲۰۰۸، لوئیزا و همکاران، ۲۰۰۹، یانگ و همکاران، ۲۰۱۱). شاخه‌زایی مناسبی از ریزنمونه اپی‌کوتیل مشاهده شده است. نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که ریزنمونه اپی‌کوتیل مناسب برای شاخه‌زایی در لیموترش است.

تاکنون در هیچ رقمی از مرکبات باززایی با استفاده از ریزنمونه برگ‌لپه‌ای گزارش نشده است. اگرچه ریزنمونه برگ‌لپه‌ای باززایی ضعیف‌تری نسبت به ریزنمونه اپی‌کوتیل و برگ نشان داد اما دست‌یابی به ریزنمونه برگ‌لپه‌ای آسان‌تر و نیاز به زمان کمتری دارد بنابراین ریزنمونه برگ‌لپه‌ای نیز می‌تواند گزینه‌ی مناسبی برای باززایی در مرکبات باشد.

۳-۳-۳- بررسی اثر غلظت هورمون NAA بر درصد ریشه‌زائی و تعداد ریشه‌زائی لایم (ژنوتیپ جهرم)

شاخساره‌ها در ۹ هفته پس از کشت ریزنمونه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی با سه غلظت متفاوت از هورمون NAA انتقال داده شدند. یک هفته بعد ریشه‌زایی در بعضی از شاخساره‌ها مشاهده گردید (شکل، ۳-۲۲ (الف)). دو هفته پس از انتقال شاخساره‌ها به محیط کشت ریشه‌زائی تقریباً تمامی شاخساره‌ها ریشه‌دار شدند (شکل، ۳-۲۲ (ب)). نتایج تجزیه واریانس اثر معنی‌داری از غلظت هورمون بر درصد ریشه-زایی و تعداد ریشه‌زایی نشان نداد .



شکل ۳-۲۰: اثر نوع ریزنمونه بر درصد شاخه‌زایی

جدول ۳-۶: تجزیه واریانس اثر هورمون و نوع ریز نمونه بر تعداد شاخه‌زایی

S.O.V	Df	MS
هورمون	۱۱	۰/۵۴۰ ns
ریزنمونه	۲	۰/۵۳۵*
هورمون × ریزنمونه	۲۲	۰/۵۳۶ns
خطا	۷۲	-

* معنی داری در سطح ۵٪ و ns عدم معنی داری.

شکل ۳-۲۱: اثر نوع ریزنمونه بر تعداد شاخه‌زایی

شکل ۳-۲۲: ریشه‌زائی شاخساره‌های باززا ۲ هفته پس از کشت (الف). رشد گیاهچه‌ها ۳ هفته پس از ریشه‌زائی

.

۳-۴- نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد محیط کشتMS نسبت به محیط کشت MT بر درصد کال‌زائی ریزنمونه‌های گره و میان گره موثرتر است. دو ژنوتیپ لایم که در این تحقیق استفاده شد نسبت به لیمو خارکی واکنش مناسب‌تری نسبت به درصد کال‌زایی در محیط کشت MS و MT از خود نشان دادند.

درصد کال‌زائی، رشد کالوس و نوع بافت کالوس در ریزنمونه اپی‌کوتیل بیش‌تر از ریزنمونه برگ و برگ لپه‌ای است. ریزنمونه‌ی اپی‌کوتیل در دو محیط کشت ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کنیتین حداکثر میزان کالوس‌زایی را نشان دادند. . حداکثر میزان کالوس با بافت فشرده در ریزنمونه اپی‌کوتیل مشاهده شد و کمترین میزان کالوس با بافت فشرده در ریزنمونه برگ مشاهده شد. ریزنمونه اپی‌کوتیل و برگ‌لپه‌ای در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین میزان رشد را نشان دادند و ریزنمونه‌های برگ در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D با ۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین حداقل میزان رشد را نشان دادند. هیچ‌گونه تغییری در کالوس‌های انتقال داده شده به محیط کشت جنین‌زائی و باززائی مشاهده نگردید و تنها تعدادی از کالوس‌ها سبزرنگ شدند.

از ۱۲ محیط کشت با غلظت هورمونی مختلف به کار برده شده در باززائی مستقیم ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل، برگ و برگ لپه‌ای بیش‌ترین درصد شاخه‌زایی، در محیط کشت یک میلی‌گرم در لیتر BAP با یک میلی‌گرم در لیتر زئاتین مشاهده شد. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ حداکثر درصد باززایی را نشان دادند. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و برگ تعداد شاخساره بیشتری تولید نمودند. نتایج تجزیه واریانس اثر معنی‌داری از غلظت هورمون NAA بر درصد ریشه‌زایی و تعداد ریشه‌زایی نشان نداد.

۳-۵- پیشنهادات

استفاده از نهال لیموترش ولیمو خارکی نیاز به گلخانه مناسب برای گیاهان گرمسیری دارد و نبود شرایط مناسب منجر به ضعف گیاه مادری می‌گردد و به جهت دشواری‌های ضدعفونی ریزنمونه‌های جدا شده از نهال و امکان وجود آلودگی درونی در ریزنمونه‌های فوق بهتر است از روش کشت بذر برای دریافت ریزنمونه استفاده نمود.

انتخاب ریزنمونه مناسب از مهم‌ترین مسائلی است که باید مد نظر قرار گیرد. اگرچه نتایج برتری ریزنمونه اپی‌کوتیل نسبت به ریزنمونه برگ لپه‌ای بر درصد کال‌زائی و باززائی مستقیم نشان را نشان می‌دهد اما کوتاه بودن زمان دست یابی به ریزنمونه برگ لپه‌ای (حداقل چهار هفته) پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی از ریزنمونه فوق بیش‌تر استفاده گردد.

استفاده از محیط‌های کشت با تیمارهای هورمونی جدید و تغییر در برخی از مواد بکار رفته در ساخت محیط‌های کشت مانند آمونیوم، کازئین هیدرولیزات و ساکاروز بر روی جنین‌زایی موثر است با توجه به موثر نبودن تغییرات ساکاروز بر جنین‌زائی لیموترش برای تحقیقات بعدی پیشنهاد می‌شود تغییرات آمونیوم و کازئین هیدرولیزات مورد بررسی قرار گیرد.

از جمله عوامل موثر بر جنین‌زایی سوماتیکی ایجاد تنش به کالوس‌های جنین‌زا می‌باشد با توجه به آن که تنش غذائی در تحقیق فوق نا کارآمد نشان داد بررسی تنش‌های دمائی در تحقیقات بعدی توصیه می‌شود.

هورمون زئاتین بیشتر در باززائی گیاهان علفی استفاده شده است نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد هورمون زئاتین مناسب در باززائی لیموترش است بنابراین استفاده از هورمون زئاتین در باززائی گیاهان خشبی به خصوص مرکبات توصیه می‌شود.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که کالوس‌های لیموترش نسبت به باززائی سر سخت هستند از آنجائی که جنین‌های سوماتیکی بیشتر در پروژه‌های انتقال ژن کاربرد دارند توصیه می‌شود در سایر روش‌های اصلاحات لیموترش از روش باززائی مستقیم استفاده گردد.

فهرست منابع:

ابراهیمی، ی، (۱۳۸۶) "دورگ گیری مرکبات"، مجموعه مقالات سمینار، مسائل و مشکلات مرکبات کشور" سازمان ترویج کشاورزی، ص ۵۰.

الهی نیا، ع، (۱۳۸۳) "کشت و کار گیاهان گرمسیری و نیمه گرمسیری در ایران" چاپ دوم، انتشارات چهره، ص ۶۸.

آمار نامه کشاورزی، (۱۳۸۷) اداره آمار و اطلاعات معاونت طرح و برنامه ریزی وزارت جهاد کشاورزی.

خوشخوی م، (۱۳۷۷) "فنون کشت بافت برای گیاهان باغبانی" چاپ هفتم، انتشارات دانشگاه شیراز، ص ۴۳۶.

شرفی ع، قاسمی ی، عبدی ر، (۱۳۹۰) پایان نامه ارشد، بررسی تنوع ژنتیکی مرکبات ترش استان هرمزگان با استفاده از نشانگرهای ملکولی SSR، دانشگاه پیام نور.

فارسی م، باقری ع، (۱۳۸۳) "اصول اصلاح نباتات" چاپ سوم، انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد، ص ۳۷۶.

فتوحی قزوینی ر، اوغلی ح، یوسفی ر، (۱۳۷۷) "کشت تعلیق سلولی، جداسازی و امتزاج پروتوپلاست دو گونه بی‌بذر پرتقال واشنگتون ناول و نارنگی انشو" مجله علوم کشاورزی ایران، دانشگاه تهران، دوره ۲۹، ص ۵-۱۲.

فروتن آ، وادیدار ر، (۱۳۸۵) "کشت بافت گیاهی" چاپ اول، انتشارات سپهر، تهران، ص ۳۰، ۱۱۱، ۲۱۸

قزوینی م ر، فتوحی ج، (۱۳۸۵) "پرورش مرکبات در ایران"چاپ چهارم، انشارات دانشگاه مازندران، ص ۲۷۵.

کریمی علویجه م، عبادی ع و امیدی م، (۱۳۸۹)، پایان نامه کارشناسی ارشد، جنین‌زائی سوماتیکی در انگور، دانشکده بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی دانشگاه تهران.

مرتضوی س ع، ضیاء الحق ح ر، (۱۳۸۳) "فناوری فرآوری ، فرآورده‌های جانبی در مرکبات" چاپ دوم، انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد، ص ۱۷۵.

نصیری م، فیفایی ر، نجفی ک، بشیری صدر ز، (۱۳۸۴) "بررسی و انتخاب مناسب‌ترین ارقام مرکبات جهت استخراج هسپریدین" گزارش نهائی طرح تحقیقاتی، موسسه تحقیقات مرکبات، رامسر.

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

Agrawal, R. and Patwardhan, M. V. (1993). "Production of peroxidase enzyme by callus cultures of *Citrus aurantifolia* Swing." **J sci Food Agric** (61): 377-378.

Almeida, W. A. B., Derbyshire, M. T. V. C., Mour, F. A. A. and Mendes, B. M. J. (2003). "The use of the *PMI/mannose* selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck)." **Plant Cell Rep** (22): 122–128.

Ballester, A., Cervera, M. and Pena, L. (2008). "Evaluation of selection strategies alternative to *nptII* in genetic transformation of citrus" **Plant Cell Rep** (27): 1005–1015.

Cabasson, C., Ouitrault, P., Cote, F. i.-X., Michaux, N., Dambier, D., Dalnic, R. and Teisson, C. (1995). "Characteristics of Citrus cell cultures during undifferentiated growth on sucrose and somatic embryogenesis on galactose" **Physiologia Plantarum**(93): 464-470.

Cervera, M., Navarro, A., Navarro, L. and Pena, L. (2008). "Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration" **Tree Physiology** (28): 55–66.

Cervera, M., Navarro, L. and Pena, L. (2009). "Gene stacking in 1-year-cycling *APETALA1* citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues" J**ournal of Biotechnology** (140): 278–282.

Costa, M. G. C., Otoni, W. C. and Moore, G. A. (2002). "An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing *carotenoid biosynthetic* genes." **Plant Cell Rep** (21): 365–373.

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." **Scientia Horticulturae** (100): 63–74

Einset, J. W., Lyon, J. L. and Sipes, D. L. (1981). "Auxins in relation to abscissionin excised pistils." **Plant Physiol** (67): 1109-1112.

Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T. and Omura, M. (2005). "Ectopic expression of an *FT* homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.)." **Transgenic Research** (14): 703–712.

Fang, D., Jin, S., Hong, N., Zhong, Y., Cao, Q., Yi, G. and Wang, G. (2008). "Vitrification–cryopreservation, an efficient method for eliminating Candidatus Liberobacter asiaticus, the citrus *Huanglongbing* pathogen, from in vitro adult shoot tips." **Plant Cell Rep (**27): 241–250.

Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W. and Roose, M. L. (1998). "Phylogenetic relationship within the genus citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPID analysis." **Theoritical Apply Genetic** (96): 812-822.

Garcia, R. M. J., Asins, M. J., Forner, J. and Carbonell, E. A. (2000). "Genetic analysis of apomixis in citrus and poncirus by molecular marker." **Theoritical Apply Genetic** (99): 411-518.

Ghazvini, M.R. (1996). "Tissue culture and frost tolerance studies in citrus." SPD. Ph.D. Thesis, university of salford.U.K

Gavish, H., Vardi, A. and Fluhr, R. (1991). "Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus sinensis* nucellar cultures" **Physiologia Plantarum**(82): 606-616.

Ghorbel, R., Dominguez, A., Navarro, L. and Pena, L. (2000). "High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the *coat protein* gene of *citrus tristeza* virus" **Tree Physiology** (20): 1183–1189

Grosser, J. W. and Gmitter, F. G. (2000). "Protoplast fusion and citrus improvment." **Theoritical Apply Genetic**. (4): 340-347.

Grosser, J. W. and Dutt, M. (2010). "An embryogenic suspension cell culture system for Agrobacterium-mediated transformation of citrus" **Plant Cell Rep** (29): 1251–1260.

Kayim, M., Ceccardi, T. L., Berretta, M. J. G., Barthe, G. A. and Derrick, K. S. (2004). "Introduction of a citrus blight-associated gene into Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbc. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by *Agrobacterium*-mediated transformation." **Plant Cell Rep** (23): 377–385.

Kayim, M. and Koc, N. K. (2006). "The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture." **Scientia Horticulturae** (109): 29–34.

Khan, E. U., Xing, X., Fang, J. W.J., Huang, X. S., Zhang, G. N., Shi, J. and Liu, J. H. (2009). "Regeneration and characterization of plants derived from leaf in vitro culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars." **Scientia Horticulturae** (120): 70–76.

Li, D. D., Shi, W. and Deng, X. X. (2003). "Factors influencing *Agrobacterium*-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the *pTA29*-barnase gene" **Tree Physiology** (23): 1209–1215.

Lopez, C., Cervera, M., Fagaoa, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R. and Pena, L (2010). "Accumulation of transgene-derived siRNAs is not sufficient for RNAi-mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime" **Molecular Plant Pathology** (11): 33–41.

Luiza, M., Oliveira, P. d., Febres, V. J., Costa, M. G. C., Moore, G. A. and Otoni, W. C. (2009). "High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration" **Plant Cell Rep** (28): 387–395.

Magdalena, C., Ballester, A. and pena, L. P. (2007). "Efficient production of transgenic citrus plants using isopentenyl transferase positive selection and removal of the marker gene by site-specific recombination." **Plant Cell Rep** (26): 39–45.

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., Lamalfa, S., continella, G. and Tribulato, E. (2000). "Citrus phylogency and genetic of important species as investigated by molecular marker " **Theoritical Apply Genetic**.(100): 1155-1116.

Pena, L., Cervera, M., Juárez, J., Navarro, A., Pena, J. A. and Navarro, L. (1997). "Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration." **Plant Cell Reports** (16): 731–737.

Rai, M. (2006). "Refinement of the Citrus tristeza virus resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region" **Plant Molecular Biology** (61): 399–414.

Simone, G. W. (2000). "Postharvest disease control in citrus." Florida Cooperative Extention service. Xiao, B. W.-., JingWang,D. S, Ji-H. L and Xiu-X.D.(2009). "Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryo genesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced byglycerol" **Journal of Plant Physiology** (166): 52—62.

Soost, R. k. and Roose, M. L. (1996). "Breeding tropical and sub tropical fruits." **Narosa publishing house**: 85-101.

Xiao, B. W., Jing. W., Ji-Hong, L. and Xiu, X.D. (2009). "Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (Citrus sinensis) induced by glycerol" **Journal of Plant Physiology** (166): 52—62.

Yang, L., Hu, C., Li, N., Zhang, I., Yan, J. and Deng, Z. (2011). "Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with *pthA-nls* for acquiring resistance to citrus canker disease" **Plant Mol Bio** (75): 11–23.

Yelenosky, G. (1991). "Responses and adaptation of citrus trees to enviromental stresses." **Israel Journal Botany** (40): 239-250.

Zanek, M. A. C., Reyes, C. A., Cervera, M., Pena, E. J., Vela´zquez, K., Costa, N., Plata, M. I. S., Grau, O., Pena, L. and Garcia, M. A. L. (2008). "Genetic transformation of sweet orange with the *coat protein* gene of Citrus *psorosis virus* and evaluation of resistance against the virus." **Plant Cell Rep** (6): 130-138.

Zhang, J.-E., Wen-Wu, G. and Xiu-Xino, D. (2006). "Relationship Between ploidy variation of Citrus calli and competence for somatic embryogenesis" **Acta Genetica Sinica** 7(33): 647-654.

Abstract

This research was carried out in three parts; Indirect regeneration node and internodes of Lisbon lime and two ecotypes of Mexican lime (namely, hormozgan and jahroum) in MS and MT media culture containing 2 mg/l 2,4-D. Indirect regeneration of epicotyl, leaf and cotyledonary leaf of the same genotype and ecotypes in MS media culture with thirteen hormonal combinations, and direct regeneration of epicotyl, leaf and cotyledonary leaf in MS with twelve hormonal combinations. Unfortunately, the first experiment was failed because of bacterial infection of produced calli. In the second experiment, explant treated with 1, 2 mg/l 2,4-D, 1, 2, 3 mg/l 2,4-D + 1mg/l kinetin produced calli. The variance was demonstrated that genotype, explant and hormone had significant effect on callus formation. Furthermore, friable and no friable calli were formed. The produced calli were moved in to photoperiod condition: light to induce shoot formation and dark to induce embryo generation. After 8 weeks of incubation, no changes in calli was observed, except for few that turned green. In the third experiment, hormone and explant had significant effect on shoot formation.

Lime, callus, embryogenic, regeneration

University of Shahrood

Faculty of agronomy plant breeding

Effect of phytohormones tissue and regeneration of lime *(citrus aurantifolia)*

Marzieh khalili

Supervisors:

Dr. Naser farrokhi

Dr. Amir mouasvi

February 2013