چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress Islamic Republic of Iran Kerman august 2005

گزینش درون شیشه اي مستقیم شاخساره هاي متحمل به نمك کلرید سدیم در برخي از پایه هاي مرکبات ایران

محمود دژم* ، مرتضي خوشخوي و اختر شکافنده
به ترتیب دانشجوي سابق دکتري علوم باغباني(در حال حاضر استادیار دانشگاه آزاد اسلامي واحد فسا) و استاد و استادیار بخش باغباني، دانشکدة کشاورزي، دانشگاه شیراز

چکیده
آزمایش هایي براي گزینش درون شیشه اي مستقیم شاخساره هاي متحمل به نمك در پایه هاي نارنج، لیموي آب، پرتقال و بکرایي انجام شد. ریزنمونه هاي محور روليه از گیاهچه هاي درون شیشه اي پایه هاي مذکور جدا شده و روي محیط کشت پایه موراشیگي و اسکوگ (MS) به همراه 3% ساکارز، 7/5 گرم در لیتر آگار، 1 میلي گرم در لیتر بنزیل آدنین (BA) وغلظت هاي مختلف کلریدسدیم (NaCl) (0، 5، 10، 5 و20 گرم در لیتر) کشت شدند. افزایش غلظت NaCl تعداد ریزنمونه هاي زنده و میزان باززایي را کاهش داد به طوري که در غلظت 10 گرم در لیتر NaCl باززایي صورت نگرفت. اگرچه در غلظت 5 گرم در لیتر نمك باززایي و تولید شاخساره صورت پذیرفت، ولي میزان باززایي در مقایسه با محیط فاقد نمك داراي تفاوت معني دار بود. شاخساره هاي متحمل به نمك از محیط حاوي 5 گرم در لیتر کلرید سدیم گزینش شده وجهت بررسي ثبات ژنتیکي آنها، سه مرتبه در همین محیط زیرکشت شده و در زیر کشت چهارم به محیط فاقد نمك منتقل شدند. در زیر کشت پنجم جهت مقایسه، شاخساره هاي گزینش شده و گزینش نشده دگربار به محیط حاوي 5 گرم در لیتر کلرید سدیم منتقل شدند. شاخساره هاي گزینش شده پس از قرار گرفتن در محیط حاوي نمك به رشد و پراوري ادامه دادند، در حالي که رشد شاخساره هاي گزینش نشده در محیط حاوي نمك متوقف شده و میزان رشد و پراوري بین آنها معني دار گردید.
کلمات کلیدي : تحمل به نمك، کشت درون شیشه اي، مرکبات و تنوع سوماکلونال

Direct *in vitro* selection of salt tolerant shoots in some *Citrus* rootstocks of Iran

M. Dejam*, M.Khosh-khui and A. Shekafandeh
Former Ph.D.student of Horticultural Science (now Assistant Professor of I.A.U. Fasa Branch and Professor and Assistant Professor, Department of Horticulture,Shiraz University.

Abstract
Experiments were conducted for direct *in vitro* selection of salt-tolerant shoots in sour orange, lime, sweet orange and Bakrai rootstocks. The epicotyl explants were exised from *in vitro* seedlings of these rootstocks and cultured on basal Murashige and Skoog (MS 1962) medium containing 3% sucrose, 7.5 $g.L^{-1}$ agar, 1 $mg.L^{-1}$ Benzyladenine (BA) and various concentrations of sodium chloride (NaCl) (0,5,10,15 and 20 $g.L^{-1}$). Increasing NaCl concentration decreased the number of viable explants and regeneration, so that in 10 $g.L^{-1}$ NaCl, there was no regeneration. Although regeneration and adventitious shoot production taked place in 5 $g.L^{-1}$ NaCl, it had significant difference with regeneration in medium without salt. The salt-tolerant shoots were selected from medium with 5 $g.L^{-1}$ NaCl and to confirm genetic stability of them, they subcultured three times in this medium and in fourth subculture, they transferred to medium without salt. In fifth subculture, the selected and unselected shoots were again returned to medium with 5 $g.L^{-1}$ NaCl. The selected shoots continued to growth and proliferation after transferring them to saline medium, but the growth of unselected shoots in saline medium ceased and growth and proliferation of them became significantly different.
Key words: salt tolerance, *in vitro* culture, *Citrus* and somaclonal varation

مقدمه
شوري يکي از مهمترين تنش هاي محيطي در نواحي خشك و نيمه خشك مي باشد و موجب خسارت به بسياري ازگياهان مي گردد. مرکبات جزو حساس ترين گياهان به شوري مي باشند، بنابراين بهنژادي پايه هاي مرکبات براي تحمل به شوري اهميت بسيار زيادي دارد (Storey &Walker, 1999). روش هاي معمول بهنژادي پايه هاي مرکبات براي تحمل به شوري به وسيله آميزش بين والدين با تحمل نسبتاً بالا صورت گرفته است ولي از آن جايي که هيچ ژني براي تحمل شوري در مرکبات شناخته نشده است و همچنين روش هاي معمول بهنژادي وقت گير و غير کارا مي باشند، اين شيوه موفقيت آميز نبوده است (Garcia-Austin et al. 1995; Kochba et al.,1982).
در سالهاي اخير فنون کشت بافت افق هاي تازه اي را براي بهنژادي گياهان گشوده است. در بسياري از گونه هاي گياهي تنوع سوماکلونال و گزينش درون شيشه اي سلول هاي متحمل به نمك به وسيله کشت در روي محيط هاي حاوي نمك صورت گرفته است، هرچند در برخي موارد سلول هاي گزينش شده ناپايدار بوده و تحمل به نمك پس از کشت بر روي محيط هاي فاقد نمك از بين رفته است (Tal, 1993). در گزينش درون شيشه اي براي تحمل به نمك، سلول ها و پينه ها در معرض نمك قرار داده مي شوند و پس از گزينش سلول هاي متحمل، از آنها گياه بازرايي مي شود. روش ديگر گزينش مستقيم با کشت ريزنمونه هاي مختلف و باززايي گياه در محيط حاوي نمك مي باشد (Tal, 1993). گزينش درون شيشه اي سلول ها و بازرايي گياهان متحمل به نمك در پاره اي از گونه هاي جنس مرکبات گزارش شده است (Garcia-Austin et al., 1995; Beloualy & Bouharmont, 1992 Kochba et al., 1982). هدف از اين پژوهش، گزينش مستقيم شاخساره هاي متحمل به نمك در چهار پاية مرکبات با کشت ريزنمونه هاي محور روليه در محيط حاوي نمك بوده است.

مواد و روش ها
بذرهاي چهارپاية نارنج (*Citrus aurantium* L.) ، ليموي آب (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.)، پرتقال (*C. sinensis* (L.) Osbeck) و بکرايي (*C. limetta* Swing. * *C. reticulata* Blanco) از درختان با گرده افشاني آزاد در شهرستان داراب انتخاب شده و پس از جداسازي بذرها از ميوه، پوسته هاي بيروني و دروني آنها برداشته شده و با محلول 0/5 درصد هيپوکلريت سديم به مدت 15 دقيقه ضدعفوني و روي محيط کشت پايه موراشيگي و اسکوگ (Murashige & Skoog, 1962) (MS) حاوي 3 درصد ساکارز و 7/5 گرم در ليتر آگار کشت گرديدند. ريزنمونه هاي

محور روليه با يك سانتي متر طول از گياهچه هاي 25 روزه چهارپايه ذكر شده جدا شده و روي محيط كشت پاية MS حاوي 3 درصد ساكارز، 7/5 گرم در ليتر آگار، 1 ميلي گرم در ليتر بنزيل آدنين (BA) و غلظت هاي 0، 5، 10، 15 و 20 گرم در ليتر كلريد سديم (NaCl) كشت شدند.

پس از يك ماه تعداد ريزنمونه هاي زنده مانده، تعداد ريزنمونه هاي توليد كنندة جوانه نابجا و تعداد جوانه هاي نابجا در هر ريزنمونه ركورد برداري گرديد. ريزنمونه هاي حاوي جوانه هاي نابجا يك ماه ديگر نيز در محيط كشت رشد كرده و سرانجام تعداد شاخساره هاي بارزايي شده و طول آنها ركورد برداري شد. شاخساره هاي متحمل به نمك از محيط حاوي 5 گرم در ليتر كلريد سديم گزينش شده و سه مرتبه در همين محيط زيركشت شدند و در هر زيركشت، رشد و پرآوري شاخساره هاي گزينش شده و گزينش نشده (توليد شده در محيط فاقد نمك) مقايسه گرديد. پس از سه مرتبه زيركشت در محيط حاوي نمك، شاخساره هاي گزينش شده به محيط فاقد نمك منتقل شده و پس از 2 ماه رشد و پرآوري، ركورد برداري و با شاخساره هاي شاهد مقايسه شد. سرانجام شاخساره هاي گزينش شده، دگربار به محيط حاوي نمك منتقل شدند و رشد و پرآوري آنها با شاخساره هاي گزينش نشده در محيط حاوي نمك مقايسه شد.

تمامي آزمايش ها در قالب طرح هاي كاملاً تصادفي با 10 تكرار (10 پتري ديش حاوي 5 ريزنمونه) صورت پذيرفت، در پايان هر آزمايش تمامي داده ها جمع آوري شده و مقايسه ميانگين ها با آزمون دانكن در سطح 5 درصد با استفاده از نرم افزار SAS صورت پذيرفت.

نتايج و بحث

افزايش غلظت NaCl تعداد ريزنمونه هاي زنده را كاهش داد به طوري كه در غلظت 20 گرم در ليتر NaCl تمامي ريزنمونه ها در چهارپايه از بين رفتند. به علاوه با افزايش غلظت نمك، درصد ريزنمونه هاي واكنش دهنده كاهش يافت و در غلظت 10 گرم در ليتر NaCl به صفر رسيد (جدول 1). در محيط فاقد نمك بيشتر ريزنمونه ها باززايي نمودند، هرچند ميزان بارزايي و تعداد جوانه ها و شاخساره هاي توليد شده بين پايه هاي مختلف، تفاوت معني دار وجود داشت (جدول 1). در غلظت 5 گرم در ليتر NaCl درصد ريزنمونه هاي واكنش دهنده به طور شديدي كاهش يافت و در تمامي پايه ها تفاوت هاي معني داري در ميزان بارزايي بين محيط شاهد و محيط حاوي 5 گرم در ليتر نمك مشاهده شد (جدول 1). شاخساره هاي در حال رشد متحمل به نمك از محيط حاوي 5 گرم در ليتر نمك گزينش شده و سه مرتبه در همين محيط زيركشت شدند. در هر زيركشت، جهت مقايسه، شاخساره هاي گزينش نشده نيز در محيط فاقد نمك كشت گرديدند. اگرچه تعداد شاخساره هاي توليد شده و طول آنها در محيط فاقد نمك بيشتر از شاخساره هاي گزينش شده در محيط حاوي نمك بود، ولي در بيشتر موارد، تفاوت ها معني دار نبودند. در طي سه زيركشت متوالي ميزان پرآوري در شاخساره هاي گزينش شده و گزينش نشده افزايش يافت (شكل 1). در زير كشت چهارم، شاخساره هاي گزينش شده چهارپايه به محيط شاهد فاقد نمك منتقل شدند و مشاهده گرديد كه ميزان رشد و پرآوري آنها در مقايسه با شاخساره هاي گزينش نشده يكسان بوده و فاقد تفاوت معني دار بودند.

براي اطمينان از ثبات ژنتيكي صفت تحمل به نمك در شاخساره هاي گزينش شده، در زيركشت پنجم، آنها دگربار به محيط حاوي 5 گرم در ليتر NaCl منتقل شدند و جهت مقايسه، شاخساره هاي گزينش نشده نيز در محيط حاوي نمك قرار گرفتند. شاخساره هاي گزينش شده پس از قرار گرفتن مجدد در محيط حاوي نمك به رشد و پرآوري ادامه دادند ولي رشد شاخساره هاي گزينش نشده در محيط نمك متوقف شده و ميزان رشد و پرآوري بين شاخساره هاي گزينش شده و گزينش نشده در محيط حاوي نمك داراي تفاوت معني دار شد (شكل 2).

هرچند كوشش هايي براي استفاده از تنوع سوماكلونال و گزينش درون شيشه اي جهت جداسازي رگه ها ي سلولي متحمل به نمك در گونه هاي مركبات صورت گرفته است ولي در بسياري موارد، به دليل زمان طولاني فرايند كشت درون شيشه اي و گزينش سلولي، پتانسيل بارزايي گياه از بين رفته است (Belouali &Bouharmont, 1992; Spiegel-Roy &Ben-Hayyim, 1985; Kochba et al., 1982). در اين پژوهش از شيوة تك مرحله اي كوتاه مدت جهت گزينش درون شيشه اي شاخساره هاي متحمل به شوري در مركبات استفاده گرديد. شيوة بكار گرفته شده در اين پژوهش، موجب ساده تر گردن فرايند گزينش و كاهش زمان گرديد. اين شيوه در چندين گونة گياهي مانند كتان (Rowland et al., 1989)، چغندرقند (Freytag et al., 1990) و كلزا (Jain et al., 1991) مورد استفاده قرار گرفته است. در پايان لازم به ذكر است كه اگرچه شاخساره هاي گزينش شده متحمل به شوري به نظر پايدار و باثبات آمدند ولي بررسي مولكولي پيرامون ثبات ژنتيكي آنها و آزمايش هاي گلخانه اي و مزرعه اي مورد نياز مي باشد.

منابع

1- Beloualy, N. and J. Bouharmont. 1992. NaCl-tolerant plants of *Poncirus trifoliata* regenerated from tolerant cell lines. Theor. Appl. Genet. 83: 509-514.

2- Freytag, A. H., J.A. Wrather and A.W. Eeichsen. 1990. Salt tolerance sugar beet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts. Plant Cell Rpt. 8: 647-650.

3- Garcia – Agustin, P. and E. Primo - Millo. 1995. Selection of a NaCl-tolerant *Citrus* plant. Plant Cell Rpt. 14: 314-318.

4- Jain, S., H.S. Nainawater, R.K. Jain and J. B. Chowdhury.1991. Proline status of genetically stable salt-tolerant *Brassica juncea* L. somaclones and their parent cv. Prakash. Plant Cell Rpt. 9:684-687.

5- Kochba, J., G. Ben-Hayyim, P. Spiegel-Roy, S. Saad and H. Neumann. 1982. Selection of stable salt-tolerant cell lines and embryos in *Citrus sinensis* and *C. aurantium*. Z. Pflanzenphysiol. 106:111-118.

6- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.

7- Rowland, G.G., A. McHughen and C. McOnie.1989. Field performance of saline-affected sites of somaclonal variant of Mc Gregor flax selected for salt tolerance *in vitro*. Can. J. Plant Sci. 69:49-60.

8- Spiegel-Roy, P. and G. Ben-Hayyim. 1985. Selection and breeding for salinity tolerance *in vitro*. Plant Soil 89:243-252.

9- Storey, R. and R.R. Walker. 1999. *Citrus* and salinity. Sci. Hortic. 78:39-81.

10- Tal, M. 1993. *In vitro* methodology for increasing salt tolerance in crop plants. Acta Hortic. 336:69-78.

Table 1. Adventitious shoot regeneration in control medium and NaCl-containing media in four citrus rootstocks.

NaCl concentrations (g/l)	Sweet orange			
	Survival (%)	Responding explants (%)	Bud No./explant	Shoot No./explant Shoot length (mm)
0	100a†	100a	9.6a	2.2a 9.3a
5	100a	68b	2.3b	1.2b 6.7a
10	80b	---	---	--- ---
15	8c	---	---	--- ---
20	0c	---	---	--- ---
	Bakrai			
	Survival (%)	Responding explants (%)	Bud No./explant	Shoot No./explant Shoot length (mm)
0	96a	96a	13.8a	3.3a 9.3a
5	96a	32b	3.1b	1.7b 3.8b
10	84a	---	---	--- ---
15	4b	---	---	--- ---
20	0b	---	---	--- ---
	Lime			
	Survival (%)	Responding explants (%)	Bud No./explant	Shoot No./explant Shoot length (mm)
0	100a	100a	5.1a	0.9a 6.8a
5	92a	40b	1.4b	1.4a 5.7a
10	80a	12c	0.6b	0.6a 1.2b
15	32b	---	---	--- ---
20	0c	---	---	--- ---
	Sour orange			
	Survival (%)	Responding explants (%)	Bud No./explant	Shoot No./explant Shoot length (mm)
0	100a	76a	2.2a	1.1a 5.1a
5	96ab	12b	0.8b	0.6a 2.2a
10	84b	---	---	--- ---
15	44c	---	---	--- ---
20	0d	---	---	--- ---

Means in each column with similar letters are not significantly different at 5% level of propability using DNMRT.

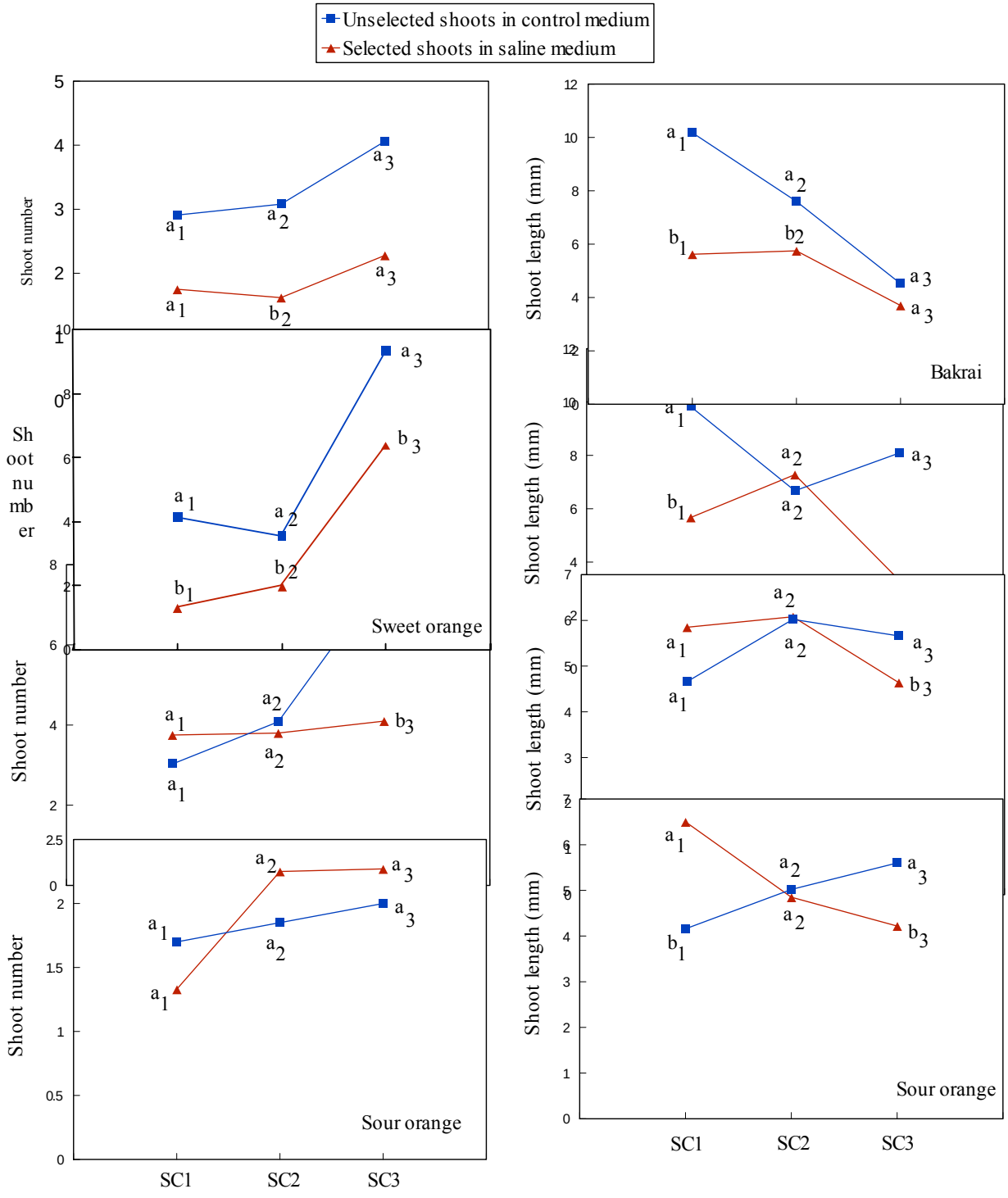

Figure 1. Comparision of growth and proliferation of selected and unselected shoots in three subcultures.

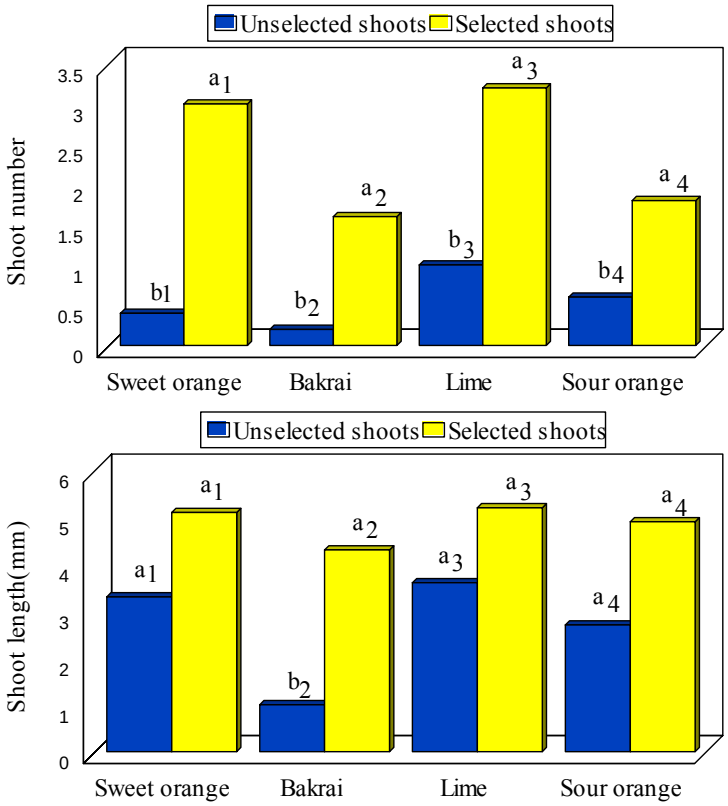

Figure 2. Comparision of growth and proliferation of selected and unselected shoots in saline medium.