

ΑΜΕΣΗ ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ ΝΕΡΑΤΖΙΑΣ *IN VITRO* ΑΠΟ ΕΚΦΥΤΑ ΕΠΙΚΟΤΥΛΙΟΥ

Π. Α. Ρούσσοσ και Γ. Δημητρίου

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 118 55

Περίληψη

Σκοπός της παρούσης ερευνητικής εργασίας ήταν η άμεση οργανογένεση σε έκφυτα επικοτυλίου νεραντζιάς, με στόχο την επίτευξη του υψηλότερου δυνατού ποσοστού, ώστε μελλοντικά αυτή η μέθοδος να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα παραγωγής διαγονιδιακών φυτών νεραντζιάς με συγκεκριμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Για το σκοπό αυτό σπόροι νεραντζιάς εγκαταστάθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Tucker και αναπτύχθηκαν στο σκοτάδι σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για τριάντα ημέρες και ακολούθως υπό φωτοπερίοδο 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι για άλλες περίπου 10 ημέρες. Από τα σπορόφυτα που προέκυψαν ελήφθησαν τεμάχια από το επικοτύλιο τα οποία και τοποθετήθηκαν οριζόντια στο προαναφερθέν υπόστρωμα εφοδιασμένο όμως με τις κυτοκινίνες βενζυλαδενίνη (BA), κινετίνη (K) και ισοπεντυλ-αδενίνη (2iP) σε συγκεντρώσεις 0.25, 0.5 και 1.0 mg l⁻¹. Τα έκφυτα παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για 45 ημέρες υπό συνθήκες 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι και 24 °C. Μετά το πέρας της περιόδου αυτής μετρήθηκε το ποσοστό άμεσης οργανογένεσης (με την παρουσία ή όχι νέων βλαστών στα άκρα των επικοτυλίων), ο αριθμός των βλαστών ανά επικοτύλιο, καθώς και το μήκος των βλαστών αυτών. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι το υψηλότερο ποσοστό άμεσης οργανογένεσης (70%) επιτεύχθηκε με τη χρήση K σε συγκέντρωση 0.25 mg l⁻¹. Δεν ανταποκρίθηκαν τα έκφυτα επικοτυλίων στην παρουσία 2iP στο υπόστρωμα οργανογένεσης, ενώ η προσθήκη BA στο υπόστρωμα έδωσε παρόμοια αποτελέσματα με την K, με ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά άμεσης οργανογένεσης αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Τα πειράματα συνεχίζονται για την πιθανή εξεύρεση συνδυασμού φυτορρυθμιστικών ουσιών που να επιτυγχάνουν υψηλότερα ποσοστά οργανογένεσης.

Εισαγωγή

Η νεραντζιά αποτελεί εδώ και δεκαετίες το βασικό υποκείμενο των εσπεριδοειδών στη χώρα μας, με τάση όμως τα τελευταία χρόνια να αντικαθίσταται από άλλα υποκείμενα (κυρίως υβρίδια τρίφυλλης πορτοκαλιάς) λόγω της ευαισθησίας της στην καταστρεπτική ίωση τριετώσα. Επειδή όμως τα υβρίδια της τρίφυλλης πορτοκαλιάς παρουσιάζουν ευαισθησία σε συνθήκες εδάφους όπως η υψηλή συγκέντρωση ανθρακικού αεραερίου, στο οποίο είναι πλούσια τα ελλληνικά εδάφη, πολλές προσπάθειες γίνονται για τη γενετική βελτίωση της νεραντζιάς με σκοπό την παραγωγή γονοτύπων ανθεκτικών στην ίωση. Για να επιτευχθούν όμως ικανοποιητικά ποσοστά επιτυχημένης μεταφοράς γενετικού υλικού, θα πρέπει πρώτα να εξασφαλιστεί η επιτυχημένη άμεση οργανογένεση των εκφύτων αυτών. Μία μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι αυτή της άμεσης οργανογένεσης εκφύτων νεραντζιάς και κυρίως εκφύτων επικοτυλίου (Maggon and Singh, 1995; Garcia-Luis et al., 1999). Σκοπός της παρούσης ερευνητικής εργασίας λοιπόν είναι η μελέτη της επίδρασης διαφόρων κυτοκινινών στην άμεση οργανογένεση επικοτυλίων νεραντζιάς *in vitro*.

Υλικά & Μέθοδοι

Προσεκτικά απομακρύνθηκαν τα περιβλήματα σπόρων νεραντζιάς και απολυμάνθηκαν με 60% κ.ο. υποχλωριώδες νάτριο για δέκα λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Οι σπόροι στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες όπου είχαν προστεθεί 10 ml βασικού υποστρώματος Murashige & Tucker (MT) pH 5.2. Οι σπόροι παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για 30 ημέρες υπό συνεχές σκοτάδι και στη συνέχεια για 10 ημέρες υπό φωτισμό, 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι, στους 24 °C. Τεμάχια επικοτυλίου τοποθετήθηκαν οριζόντια σε υπόστρωμα MT εφοδιασμένο με τις κυτοκινίνες βενζυλαδενίνη (BA), κινετίνη (K) και ισοπεντυλ-αδενίνη (2iP) σε συγκεντρώσεις 0.25, 0.5 και 1.0 mg l⁻¹. Τα έκφυτα παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για 45 ημέρες υπό συνθήκες 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι και 24 °C. Μετά το πέρας της περιόδου αυτής μετρήθηκε το ποσοστό άμεσης οργανογένεσης (με την παρουσία ή όχι νέων βλαστών στα άκρα των επικοτυλίων), ο αριθμός των βλαστών ανά επικοτύλιο και το μήκος των βλαστών αυτών. Το πείραμα ακολούθησε το εντελώς τυχαίο δι-παραγοντικό (ένας παράγοντας οι κυτοκινίνες και ο άλλος οι συγκεντρώσεις αυτών) σχέδιο με τέσσερις επαναλήψεις των πέντε εκφύτων. Τα αποτελέσματα υπέστησαν ανάλυση διασποράς και οι διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του τυπικού σφάλματος της ανάλυσης διασποράς του παραγοντικού πειράματος σε επίπεδο σημαντικότητας α=0.05.

Πίνακας 1. Σημαντικότητα των επιδράσεων των επεμβάσεων με κυτοκινίνες στο μέσο ποσοστό οργανογένεσης, το μέσο αριθμό βλαστών και το μέσο μήκος ανά έκφυτο.

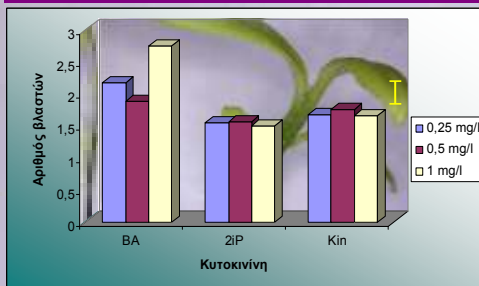
Μετρούμενες μεταβλητές	Παράγοντες		
	Κυτοκινίνη	Συγκέντρωση	Κυτοκινίνη * Συγκέντρωση
Ποσοστό οργανογένεσης	ns	ns	ns
Αριθμός βλαστών	p<0.01	ns	ns
Μήκος βλαστών (cm)	ns	ns	ns



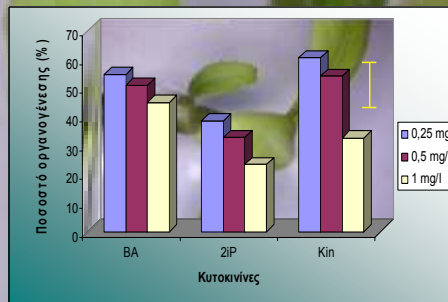
Εικόνα 1. Έκπτυξη και ανάπτυξη βλαστών σε επικοτύλιο νεραντζιάς.

Αποτελέσματα

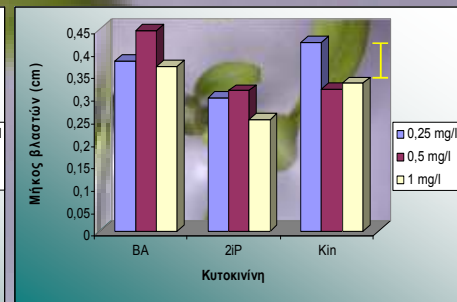
Στον πίνακα 1 φαίνεται ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των επεμβάσεων με κυτοκινίνες όσο και μεταξύ των συγκεντρώσεων αυτών, αλλά ούτε και σημαντική αλληλεπίδραση, όσον αφορά το ποσοστό άμεσης οργανογένεσης. Το είδος όμως της κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των παραγομένων βλαστών ανά έκφυτο, ενώ δεν υπήρχε καμία σημαντική επίδραση των παραγόντων όσον αφορά το μήκος των βλαστών, όπως φαίνεται και στα παρακάτω σχεδιαγράμματα.



Σχεδιάγραμμα 3. Επίδραση της συγκέντρωσης και του τύπου της κυτοκινίνης στον μέσο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο επικοτυλίου νεραντζιάς.



Σχεδιάγραμμα 1. Επίδραση της συγκέντρωσης και του τύπου της κυτοκινίνης στο ποσοστό άμεσης οργανογένεσης εκφύτων επικοτυλίου νεραντζιάς.



Σχεδιάγραμμα 2. Επίδραση της συγκέντρωσης και του τύπου της κυτοκινίνης στο μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο επικοτυλίου νεραντζιάς.

Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος γίνεται αντιληπτό ότι ενώ ο τύπος της κυτοκινίνης δεν είχε σημαντική επίδραση επί του ποσοστού οργανογένεσης, εντούτοις η προσθήκη 2iP στο υπόστρωμα έδωσε τα χαμηλότερα ποσοστά. Τα ποσοστά οργανογένεσης είναι παρόμοια με αυτά που αναφέρουν άλλοι ερευνητές για τα έκφυτα εσπεριδοειδών, κυρίως όσον αφορά τη χρήση BA, η οποία είναι και η πιο συνηθισμένη (Maggon and Singh, 1995; Garcia-Luis et al., 1999). Ο αριθμός των βλαστών που παρήχθησαν μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα προσπάθεια μεταφοράς γενετικού υλικού, αφού με αυτόν τον τρόπο αυξάνονται οι πιθανότητες να παραχθεί έστω και ένας γενετικά τροποποιημένος βλαστός. Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι με την προσθήκη BA και K στο υπόστρωμα οργανογένεσης επιτυγχάνονται τα υψηλότερα ποσοστά άμεσης οργανογένεσης, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν σημαντικές διαφορές με τα αντίστοιχα ποσοστά με την προσθήκη 2iP.

Βιβλιογραφία

- Garcia-Luis A., Bordon Y., Moreira-Dias JM., Molina RV., Guardiola JL. 1999. Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. *Ann. Bot.* 84: 715-723.
- Maggon R., Singh BD. 1995. Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyls explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Sci. Hortic.* 63: 123-128.