القاء کالوس از برگ بالغ پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱

سیدرضا نظامی[۱]، عباس یداللهی[۲،*]، ملیحه افتخاری[۳]، حسین حکم‌آبادی[۴]

۱و۲و۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران. ۴- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی سمنان (شاهرود)، ایران.

*نویسنده مسئول: yadollah@modares.ac.ir

چکیده

باززایی از برگ یکی از روش‌های تکثیر انبوه در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد و نسبت به تکثیر از طریق تک‌گره برتری‌ها خاصی دارد. باززایی مستقیم از طریق برگ منجر به کاهش تنوع اپی‌ژنتیک می‌گردد. ولی القاء کالوس و باززایی غیرمستقیم نیز دارای برتری‌هایی خاصی است. به منظور بررسی القاء کالوس از برگ‌های بالغ پایه رویشی یوسی‌بی-۱ از غلظت‌های مختلف سایتوکینین‌های مختلف به همراه غلظت‌های مختلف اکسین‌های مختلف استفاده گردید. استفاده از تیمار ترکیبی ۱ میلی‌گرم برلیتر Kin به همراه ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر ایندول بوتیریک‌اسید در محیط کشت پایه MS + ۳٪ ساکارز+ ۶/۲ گرم برلیتر آگارز منجر به بیشترین وزن تر کالوس تشکیل شده گردید وکمترین میزان کالوس القاء شده در تیمارهای ۲میلی‌گرم Kin + ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D و همچنین ۲میلی‌گرم Kin + ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر NAA بود.

کلمات کلیدی: القاء کالوس، برگ، پسته یوسی‌بی-۱، MS، PGR

مواد و روش‌ها

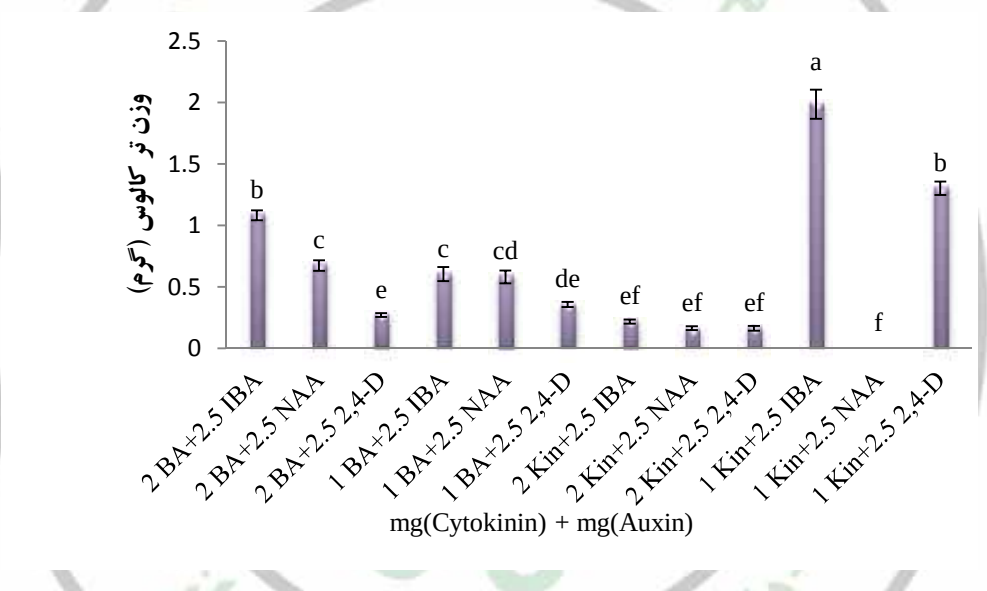
ریزنمونه‌های برگی بالغ از نهال‌های دوساله پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱ رشد کرده در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس تهیه گردید وبه آزمایشگاه ریزازدیادی گروه باغبانی منتقل گردیدند. ریزنمونه‌های برگی بعد از جداشدن از شاخه به روش توصیف شده نظامی وهمکاران (۱۳۹۴) ضدعفونی گردیدند تا مشکلات قارچی وباکتریایی آنها رفع گردد. همچنین در ادامه به منظور رفع مشکلات اولیه حاصل از فنل، به مدت ۶۰ دقیقه درون محلول ۱۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر آسکوربیک‌اسید غوطه‌ور شدند ودرادامه در محیط کشت MS به همراه ویتامین‌های گمبورگ، ۳٪ ساکارز، ۶/۲ گرم برلیتر آگارز و ترکیب مختلفی از سایتوکینین‌های مختلف (بنزیل آدنین و کینتین) با اکسین‌های مختلف (ایندول‌بوتیریک‌اسید، توفور-دی و نفتالین استیک‌اسید) کشت گردیدند تا القاءکالس صورت گیرد. بعد از ۴۰ روز کالوس‌های القاء شده از روی برگ جدا شده ووزن تر آنها با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین گردید و به منظور باززایی به محیط کشت باززایی منتقل گردیدند (داده‌ها نمایش داده نشده)

جدول ۱- ترکیب تیماری تنظیم‌کننده‌های رشد به منظور القاء کالوس از ریزنمونه‌های برگی پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱

mg Cytokine + mg Auxin	NO.	Mg Cytokine + mg Auxin	NO.
2 Kin+ 2.5 IBA	T7	2 BA+ 2.5 IBA	T1
2 Kin + 2.5 NAA	T8	2 BA+ 2.5 NAA	T2
2 Kin + 2.5 2,4-D	T9	2 BA+ 2.5 2,4-D	T3
1 Kin + 2.5 IBA	T10	1 BA+ 2.5 IBA	T4
1 Kin + 2.5 NAA	T11	1 BA+ 2.5 NAA	T5
1 Kin + 2.5 2,4-D	T12	1 BA+ 2.5 2,4-D	T6

مقدمه

ریزازدیادی پسته از سال‌ها قبل توسط برقچی (۱۹۸۲) گزارش شده است. در بیشتر مواقع از ریزنمونه‌های تک‌گره به عنوان منبع کشت استفاده می‌کردند (onay, 2000; Nezami et al., 2015). باززایی مستقیم (Tilkat et al., 2009) و غیر مستقیم از برگ قبلا گزارش گردیده است. استقرار برگ به منظور القاء کالوس لازمه باززایی غیرمستقیم می‌باشد. انگیزش کالوس براثر برهمکنش بین هرمون‌های درونی و تنظیم‌کننده‌های رشد خارجی صورت می‌گیرد. استفاده ترکیبی از اکسین و سایتوکینین به منظور تشکیل کالوس در برگ پسته ضروری می‌باشد. تیلکات و همکاران (۲۰۰۹) و ییلدیریم (۲۰۱۲) قبلا گزارش کرده اند که استفاده از تیمارهای ترکیبی از اکسین و سایتوکینین منجر به تشکیل کالوس می‌گردد ولی باید توجه داشت که نسبت بین این دو در القاء کالوس مهم می‌باشد. ترشح ترکیبات فنلی از بافت‌های برش خورده برگ منجر به عدم تشکیل کالوس و یا تولید کالوس‌های قهوه-ای می‌گردد که به منظور رفع این عارضه می‌توان از آنتی‌اکسیدان‌های مناسب و همچنین ترکیبات جاذب فنل مانند پلی‌وینیل-پایریلیدن استفاده نمود که تیلکات و همکاران (۲۰۰۹) جهت رفع فنل از آنتی‌اکسیدان‌های آسکوربیک‌اسید وسیتریک اسید به-همراه PVP استفاده کردند.



نمودار۱- تاثیر تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد برالقاء کالوس از ریزنمونه‌های برگی پایه رویشی پسته یوسی‌بی-۱

نتایج

نتایج آزمایش‌ها حاکی ازآن بود که اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارهای مختلف درسطح یک درصد وجود داشت. نتایج نشان داد که استفاده از Kin نسبت به BA بیشترین تاثیر را بر القاء کالوس داشت. استفاده از ایندول‌بوتیریک‌اسید بیشترین تاثیر را نسبت به سایر ترکیبات اکسینی در تشکیل کالوس نشان داد. برهمکنش بین سایتوکینی و اکسین نشان داد که استفاده از ۱ میی‌گرم Kin به همراه ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر IBA منجر به بالاترین وزن تر کالوس (۱/۹۸ گرم) گردید. استفاده از تیمار ۱ میلی‌گرم برلیتر Kin به‌همراه ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر NAA هیچ‌گونه واکنشی نشان نداد. کمترین میزان تشکیل کالوس مربوط به تیمارهای ۲میلی‌گرم Kin + ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر 2,4-D و همچنین ۲میلی‌گرم Kin + ۲/۵ میلی‌گرم برلیتر NAA بود. نوع برگ، اندازه برگ و نحوه کشت در میزان تشکیل و القاء کالوس به شدت موثر هستند. استفاده از برگ کامل نسبت به برگ‌های برش خورده بهتر می‌باشد. همچنین ایجاد برش‌های ظریف در پشت برگ منجر به افزایش تشکیل کالوس می‌گردد ولی استفاده از برش‌های شدید منجر به ترشح

ترکیبات فنلی و عدم کالوس‌زایی می گردد. قرار دادن پشت برگ برروی محیط کشت نسب به روی برگ، واکنش بهتری نشان داد.

بحث

گزارش‌های زیادی مبنی بر جنین‌زایی درون‌شیشه‌ای و باززایی مستقیم و غیرمستقیم وجود دارد. القاء کالوس لازمه جنین‌زایی و باززایی غیرمستقیم می‌باشد. القاء کالوس به منظور باززایی یکی از موفق‌ترین و بهترین مسیرهای انتقال ژن محسوب می‌شود و می توان بعد از القاء کالوس ژن مورد نظر را انتقال داد و نوساقه‌های باززایی کرده حامل ژن مورد نظر باشند. به همین منظور دستیابی به یک پروتکل بهینه القاء کالوس و باززایی می تواند تاثیر زیادی در ادامه برنامه‌های اصلاحی وانتقال ژن داشته باشد. برهمکنش بین تنظیم‌کننده‌های درونی و بیرونی مهم‌ترین تاثیر را درمیزان القاء کالوس از اندام‌های مختلف گیاهی دارند. نتایج آزمایشات نشان داد که استفاده از ۱ میلی گرم Kin به همراه ۲/۵ میلی گرم‌برلیتر ایندول‌بوتیریک‌اسید بیشترین تاثیر را درالقاء کالوس داشت که با نتایج عرب (۱۳۹۳) مطابقت داشت که اظهار داشت بیشترین میزان کالوس (۹۰ درصد) در بیشترین میزان هرمون مورد استفاده (۱/۵ میلی گرم‌برلیتر بنزیل‌آدنین‌پورین به همراه ۰/۵ میلی گرم نفتالین استیک‌اسید) حاصل گردید. همچنین نوع هورمون نیز در میزان تشکیل کالوس تاثیر داشت به طوریکه بیشترین بنزیل‌آدنین‌پورین بیشترین تاثیر را در تولید کالوس از خود نشان داد به طوریکه نتایج آزمایش‌های شریف‌مقدم و همکاان (۲۰۱۱) حاکی ازآن بود که استفاده از بنزیل‌آدنین تاثیر بیشتری در القاء کالوس نسبت به TDZ دارد. نوع اکسین مورد استفاده و همچنین غلظت مورد استفاده یک فاکتور مهم در القاء کالوس به‌شمار می‌رود. اکسین نسبت سیتوکنین نشان دهنده یک سیگنال مهم در شکل گیری فنوتیپ سلول و همچنین در زمان شروع و نگهداری از فرایند تقسیم سلولی است. از آنجائیکه اکسین ها تحریک کننده تقسیم سلولی هستند در تشکیل و ظهور مریستم در هر دوی بافت های سازمان نیافته یا اندام های معین درگیر هستند(George et al., 2007). ایندول‌بوتیریک‌اسید بیشترین تاثیر را درالقاء کالوس نسبت به سایر ترکیبات اکسینی مورد استفاده از خود نشان داد این درحالی است که نتایج آزمایش‌های پرزجیمنز و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که تیمار ترکیبی ایندول‌بوتیریک‌اسید به‌همراه بنزیل‌آدنین بیشترین تاثیر را درالقاء کالوس دارد و استفاده از نفتالین‌استیک‌اسید منجر به باززایی کالوس‌ها در ارقام و پایه‌های بادام و هلو می گردد. استفاده از 2,4-D کمترین تاثیر را دراقاء کالوس داشت. نوع اندام مورد استفاده به منظور القاء کالوس نیز در میزان تولید کالوس و در ادامه باززایی تاثیر زیادی دارد. بررسی نتایج گذشت حاکی از آن است که در گذشته از بذر به عنوان منبع برای القاء کالوس استفاده می‌شد ولی نتایج آزمایش‌های اخیر حاکی ازآن است که استفاده از برگ بهترین منبع برای تولید و تشکیل کالوس می‌باشد (Pe´rez-Jime´nez et al., 2012). این درحالی است که نتایج آزمایشات Gentile و همکاران (۲۰۰۲) حاکی ازآن است که باززایی از برگ در گیاهان بالغ هلو دشوار است. همچنین نتایج عرب (۱۳۹۳) نشان داد که بیشترین میزان کالوس‌زایی و باززایی مربوط به برگ و دمبرگ متصل به برگ می‌باشد چرا که محل اتصال برگ به دمبرگ بیشترین پتانسیل و استعداد باززایی را دارد. همچنین نوع ریزنمونه برگی استفاده شده نه تنها در میزان تشکیل کالوس تاثیر داشتند بلکه در ادامه در میزان باززایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. برگ کامل و قسمت پایه(پایین برگ) به طور معنی داری باززایی بهتری از قسمت میانه و انتهایی برگ نشان می‌دهد. نتایج آزمایش‌های عرب (۱۳۹۳) نشان داد که شاخه های بیشتری از قسمت های میانی و انتهایی باززایی داشتند. این تفاوت های کمرنگ در مقایسه با شاهد نشان می‌دهد که بافت های پایه در منطقه دمبرگ در مقایسه با سایر بافت ها توسط اکسین بیشتر تحریک می‌شوند.

منابع

۱. عرب، م.م، یداللهی، ع، مزینانی، م (۱۳۹۳)، ازدیاد درون‌شیشه‌ای پایه رویشی (15) G×N (هیبرید هلو× بادام) و ارزیابی ثبات ژنتیکی گیاهان حاصله با نشانگرهای ملکولی ISSR، پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، ۳۲۰ ص

۲. نظامی، س. ر.، یداللهی، ع.، حکم‌آبادی، ح. و سجادی سنجانی، ف. س. (۱۳۹۴). بهبود رفع آلودگی قارچی و باکتریایی در ریزنمونه‌های پایه رویشی پسته یوسی‌بی ۱. همایش بین‌المللی پژوهش‌های کاربردی در کشاورزی. ۲۲۳ ص.

3. Barghchi, M., 1982. In vitro propagation of Pistacia species. Ph.D. Thesis. University of Nottingham, Nottingham, UK, 117 pp

4. Işıkalan, C., Akbaş, F., Namlı, S., & Başaran, D. (2010). Adventitious shoot development from leaf and stem explants of Amygdalus communis L. cv. Yaltinski. *Plant Omics*, *3*(3), 92-96.

5. Nezami, S. R., Yadollahi, A., Hokmabadi, H., & Eftekhari, M. (2015). Control of Shoot Tip Necrosis and Plant Death during in Vitro Multiplication of Pistachio Rootstock UCB1 (Pistacia integrima× P. atlantica). *Journal of Nuts (IJNRS)*,*6*(1).

6. Onay, A., 2000. Micropropagation of pistachio from mature trees. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60, 159–162.

7. Pérez-Jiménez, M., Carrillo-Navarro, A., & Cos-Terrer, J. (2012). Regeneration of peach (Prunus persica L. Batsch) cultivars and Prunus persica× Prunus dulcis rootstocks via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *108*(1), 55-62.

8. SHARIFMOGHADAM, N., SAFARNEJAD, A., & TABATABAEI, S. M. (2011). The Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Regeneration of Amygdalus communis. *Notulae Scientia Biologicae*, *3*(3), 97-100.

9. Tilkat, E., Onay, A., Yıldırım, H., & Ayaz, E. (2009). Direct plant regeneration from mature leaf explants of pistachio, Pistacia vera L. *Scientia horticulturae*,*121*(3), 361-365.

10. Yıldırım, H. (2012). Micropropagation of Pistacia lentiscus L. from axenic seedling-derived explants. *Scientia horticulturae*, *137*, 29-35.

Leaf callus induction in UCB-1 pistachio vegetative rootstock

S. R. Nezami[1], A. Yadollahi[2]*, H. Hokmabadi[4], M. eftekhari[3]

1- MS_c student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 2-Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 3- Ph.D. Candidate , Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University (TMU), Tehran, Iran. 4- Scientific Member of Semnan (Shahrood) Agricultural Research Center, Iran.

*Corresponding author: yadollah@modares.ac.ir

Abstract

In vitro regeneration from leaf is one of the massive propagation methods and includes some priorities toward single node regeneration. Direct regeneration from leaf decreases epigenetic diversity but callus induction and indirect regeneration is also critical. In order to callus induction of mature leaves in UCB-1 pistachio vegetative rootstock, different concentrations of various cytokinins were used. 1 mg/l kinetin + 2.5 mg/l indole butyric acid in basal Murashige and Skoog medium resulted in the highest callus fresh weight of and the lowest callus induced in the treatment of 2 mg/l kinetin + 2.5 mg/l 2,4-D and 2 mg/l kinetin + 2.5 mg/l naphthalene acetic acid.

Key words: cullus induction, leaf, pistachio UCB-1, PGR