بررسی تغییرات سوماکلونال در لاین‌های تراریخته گل رز

فائزه خاتمی[1*]، فرزانه نجفی[2]، فتانه یاری[3]، رمضانعلی خاوری نژاد[4]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. ۲-استادیار گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. ۳- استادیار گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران. ۴- استاد گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران و گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: f_khatami_7@yahoo.com

چکیده

گل رز (*Rosa hybrida* L.) به عنوان ملکه گل‌ها در جهان شناخته می شود. یکی از روش های رایج در تولید انبوه گیاهان اصلاح شده، تکثیر از طریق روش‌های رویشی و بالاخص شیوه کشت بافتی است. ارزش تجاری بالا و کشت گسترده گل رز به عنوان یک محصول زینتی سبب شده است که توجه به‌نژادگران را برای بهبود صفات ارزشمند آن، به سوی کاربرد مهندسی ژنتیک معطوف دارد. از سوی دیگر، ابزار اصلی مورد استفاده در مهندسی ژنتیک نیز، کشت بافت سلولی است که از مشکلات رایج این شیوه می توان به بروز تغییرات ناخواسته سوماکلونال، درگیاهچه های تولید شده اشاره نمود. جنین زایی رویشی و باززایی غیرمستقیم می تواند بهترین بافت گیرنده ژن را در مهندسی ژنتیک فراهم نماید. در پژوهش حاضر، پس از تولید جنین های رویشی از طریق کشت بافت، ژن های هدف از طریق هم کشتی با آگروباکتریوم به جنین‌ها انتقال داده شده و پس از طی مراحل باززایی، گیاهان تراریخته به گلخانه انتقال داده شدند. به منظور بررسی احتمال بروز تغییرات سوماکلونال در طی روند رشد از مرحله استقرار تا گلدهی، کلیه صفات ظاهری در بوته و به ویژه در گل‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، گیاهان تراریخت شده چه با ژن هدف *etr1-1*، چه سازه ژنی *gus*، نسبت به گیاهان شاهد تفاوت معنی داری در مورفولوژی، روند رشد، شکل ظاهری برگ‌ها و گل‌ها نداشتند.

کلمات کلیدی: رز تراریخته، تغییرات سوماکلونال، *etr1-1*.

مقدمه

اهمیت جهانی گل رز به عنوان یک گیاه زینتی، مسیر تحقیقات را به سوی اصلاح ژنتیکی و معرفی ارقام جدید و برتر سوق داده است (Borissova et al., 2000). کشت بافت یک ابزار قدرتمند در انتقال ژن به گیاه شناخته شده است. به هنگام کشت بافت گیاهان، تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی، که در مجموع تغییرات سوماکلونالی نامیده می‌شوند، مشاهده شده‌اند (Sun et al., 2013). عواملی مانند ژنوتیپ ریزنمونه و نوع ریزنمونه مورد استفاده در کشت بافت نیز نقش مهمی در تغییرات سوماکلونالی بازی می‌کنند (Gaj, 2004). علاوه بر این برخی از مطالعات نشان می دهد که تجمع تغییرات ژنتیکی در طول کشت طولانی مدت در شرایط آزمایشگاهی نیز به تغییرات سوماکلونال کمک می‌کند (Gaj, 2004). همچنین قابل ذکر است که در تکنیک کشت بافت استفاده از بافت‌های بسیار متمایز همچون ریشه، برگ و ساقه در مقایسه با جوانه جانبی و راس ساقه که مریستمی هستند، سبب تنوع سوماکلونالی بیشتری می‌شوند. همچنین در کشت بافت کاربرد راس ساقه در مقایسه با جنین رویشی منجر به تنوع سوماکلونالی بیشتری می‌گردد (Bairu et al., 2011).

به طور کلی با توجه به اهمیت این گیاه زینتی و لزوم دستیابی به ارقام جدید، تولید جنین های سوماتیکی که برترین ریزنمونه قابل استفاده در روش های انتقال ژن به ویژه روش آگروباکتریوم و باززایی گیاهان تراریخته رز است، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. با توجه به زمان بر بودن فرایند دستیابی به جنین رویشی، باززایی آن از طریق کشت بافت و همینطور طولانی تر شدن این بازه زمانی با لحاظ فرایند انتقال ژن، احتمال بروز تغییرات سوماکلونال را افزایش می‌دهد. در همین راستا، در این پژوهش لزوم بررسی تغییرات احتمالی سوماکلونال در گیاهان تراریخته امری لازم و مبرهن بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش لاین‌های تراریخته رز از سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شد (Yari, 1390).

آنالیز مورفولوژیکی: ویژگی‌های مورفولوژیکی در لاین‌های تراریخته رز با ژن های *etr1-1* و *gus* و گیاهان شاهد کشت بافتی، مبنای بررسی تغییرات سوماکلونال قرار گرفتند. بدین منظور ۶ ماه پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلخانه تعداد برگچه‌ها، نسبت پهنا/طول و رنگ برگ‌ها، تعداد غنچه در هر ساقه گل‌دهنده، تعداد گلبرگ، قطر، رنگ، شکل و تعداد گل‌های غیر طبیعی، تعداد و شگل کاسبرگ به عنوان صفات مورد ارزیابی، یادداشت برداری شدند. آزمایشات بر اساس طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار تنظیم شده است (هر تکرار شامل ۲۰ گیاه).

نتایج و بحث

همانطور که پیشتر اشاره شد، کشت بافت یک ابزار اساسی در تولید، حفاظت و بهبود منابع گیاهی می‌باشد. بزرگترین مشکل کشت بافت بروز تنوع سوماکلونالی در جمعیت‌های مشتق شده از آن است. در مقابل، از آن به عنوان یک منبع جدید در تولید مطلوب کلون‌ها / واریته‌ها با صفات زراعی برتر بهره می‌برند (Bairu et al., 2011). اگرچه امروزه واژه تنوع سوماکلونالی به طور جهانی برای همه اشکال تنوعات مشتق شده از کشت بافت به کار می‌رود، واژه‌های دیگری همچون تنوع پروتوکلونال، گامتوکلونال و مریکلونال به ترتیب برای کشت‌های پروتوپلاست، پرچم و مریستم نیز به‌کار می روند (Larkin & Scowcroft, 1981). تنوع سوماکلونالی با استفاده از ارزیابی های مورفولوژی، فیزیولوژی/بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی می‌گردد (Bairu et al., 2011). در تحقیق حاضر بررسی مورفولوژیکی برای تشخیص تنوع سوماکلونالی مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج، عدم معنی‌داری صفات غیر پارامتریک مورد بررسی همچون تعداد برگچه، رنگ برگ، تعداد غنچه در هر ساقه گل‌دهنده، رنگ، شکل و تعداد گل‌های غیر طبیعی، تعداد و شکل کاسبرگ (داده‌ها ارائه نشده است) و نیز صفات پارامتریک همچون نسبت پهنا/طول در برگچه آخر و میانی، تعداد گلبرگ و قطر گل (جدول ۱) را نشان می‌دهد.

جدول ۱. تجزیه واریانس برخی صفات موفولوژیکی مورد ارزیابی در لاین‌های گل رز

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		نسبت پهنا/طول برگچه آخر	نسبت پهنا/طول برگچه میانی	تعداد گلبرگ های گل	قطر گل
لاین های گل رز	۱۷	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۰۷^{ns}	۱۳/۶۴^{ns}	۰/۲۶^{ns}
خطا	۵۴	۰/۰۰۱۲	۰/۰۱	۳/۹۳	۰/۰۳
ضریب تغییرات	-	۲/۲۲	۶/۷۳	۷/۱۴	۲/۳۲

*، ** و ^{ns} به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

شکل ۱- نمایی از یک گل غیر طبیعی(راست) در کنار گل طبیعی (چپ) مشاهده شده در بین لاین ها. با توجه به عدم معنی دار بودن تغییرات سوماکلونال، بروز حالت غیر طبیعی در این گل احتمالا بر اثر تغییرات فیزیولوژیک در طی دروه رشدی بوده است.

در طی این بررسی جنین رویشی پس از تراریختی قادر به باززایی مطلوب شد که بیانگر انتخاب صحیح بافت گیرنده ژن بوده و از سوی دیگر بررسی سایر صفات مورفولوژیکی نیز بیانگر بروز تغییرات سوماکلونال در این گیاهان نبود و هیچ تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخت شده نسبت به گیاهان شاهد مشاهده نشد. لذا مطالب ذکر شده موید این نکته می باشد که جنین زایی رویشی نه تنها بهترین بافت گیرنده ژن را فراهم می نماید، بلکه این شیوه حتی پس از طی چندین سال کشت گیاهچه در شرایط درون شیشه ای احتمال بروز تغییرات سوماکلونال را به حداقل می رساند. گزارشات موجود در خصوص پروتوکل‌های مربوط به باززایی گیاه از جنین رویشی در چندین کولتیوار رز شاخه بریده موید این نکته می باشد که تمامی گیاهچه‌های باززایی شده، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از لحاظ مورفولوژیکی کاملاً مشابه با گیاه اولیه بوده‌اند (Borissova et al., 2000)، که بیانگر پایداری ژنتیکی کلون‌های جنینی بوده و نتایج حاصل از تحقیق حاضر را نیز حمایت می‌کند.

منابع

1. Bairu, M.W., Aremu, A.O., Staden, J.V. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation. 63: 147-173.
2. Borissova, A., Tsolova, V., Angeliev, V., Atanassov, A. 2000. Somatic embryogenesis of *Rosa hybrida* L.. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 14: 44-51.

3. Gaj, M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. Plant Growth Regulation. 43: 27-47.
4. Larkin, P., Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics. 60: 197-214.
5. Sun, S.L., Zhong, J.Q., Li, S.H., Wang, X.J. 2013. Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in torenia (*Torenia fournieri* Lind.). Botanical Studies. 54: 1-7.
6. Yari, F. 1390. Optimization of transformation, regeneration and gene transfer to delay senescence in cut flower roses. PhD. Thesis.

The study of somaclonal variations in transgenic rose lines

F.Khatami[1*], F.Najafi[2], F.Yari[3], R.Khavarinejad[4]

1. Ph.D. Student of Plant Physiology, Dep. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University Tehran, Iran. 2. Assistant Professor, Dep. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University Tehran, Iran. 3. Assistant Professor, Agricultural Research Institute, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran. 4. Professor, Dep. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University and Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*****Corresponding author: F_khatami_7@yahoo.com

Abstract

Rose (*Rosa hybrida* L.) is known as the queen of the flowers in the world. Vegetative methods of propagation especially the tissue culture is the most common method for mass production of genetically modified plants. Breeders are keen to use of genetic engineering methods to enhance rose's valuable traits, due to high commercial value and extensive cultivation of cut-roses and decorative uses. Moreover, plant tissue culture was used as a powerful tool in genetic manipulation techniques. Incidence of somaclonal variations in the tissue culture propagated plant is one of the major limitations. Somatic embryogenesis is an ideal procedure of propagation and regeneration and also could be the best target tissue for genetic transformation. In the present study, target genes were transferred to somatic embryogenesis calli of cut-roses by Agrobacterium co-cultivation, follow the transgenic explants were regenerated, and then transferred to the greenhouse. During the growth season from establishment to flowering phase, morphological traits, especially flowers morphology were evaluated for somaclonal variation incidence. The results indicated that, there is no significant difference between transgenic plants either *etr1-1* or *gus* in morphology, growth, leaf and flower shape compared to the controls.

Key words: *etr1-1*, Somaclonal variation, Transgenic rose.