انگیزش رویان‌های بدنی در گل مریم

علی پورخالوئی*[۱]، مرتضی خوشخوی[۲]
[۱*] استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان، رفسنجان
[۲] استاد بخش علوم باغبانی، دانشگاه شیراز، شیراز
نویسنده مسئول: alipourkhaloee@vru.ac.ir

چکیده

گل مریم یکی از گیاهان زینتی مهم می‌باشد که ایجاد رنگ‌های نوین در گل آن از راه مهندسی ژنتیک مورد توجه می‌باشد. پس از انتقال ژن، رویان‌زایی بدنی غیرمستقیم یکی از روش‌های مهم برای باززایی درون‌شیشه‌ای گیاهان دستکاری ژنتیکی شده می‌باشد. در این پژوهش، دمگل‌های گل مریم برای انگیزش پینه‌های رویان‌زا روی محیط کشت موراشیگی و اسکوگ (۱۹۶۲) با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف، بسته به مرحله رشد و هدف، کشت شدند. پس از گذشت ۳۵ روز از آغاز کشت، پینه‌زایی در محل‌های برش خورده ریزنمونه‌ها آغاز شد. بالاترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰٪) و باکیفیت‌ترین پینه‌ها (براساس بافت و رنگ) در ترکیب هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالن‌استیک‌اسید به دست آمد. پینه‌های انگیخته شده، پس از زیرکشت روی محیط‌کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۱ میلی‌گرم در لیتر بنزیل‌آدنین، بیشترین پرآوری (رشد ۵ برابری) را داشتند. در نهایت، پینه‌هایی که تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر ابسایزیک‌اسید و ۴۵ گرم در لیتر مالتوز را دریافت داشتند، بیشینه شمار رویان‌های بدنی دوقطبی (۸۱) را در هر پتری‌دیش باززایی نمودند. براساس یافته‌های این پژوهش، کاربرد توفوردی و ابسایزیک اسید در کنار مالتوز به عنوان یک منبع کربنی مناسب برای تولید رویان‌های بدنی دو قطبی گل مریم توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: ابسایزیک‌اسید، توفوردی، کشت بافت، مالتوز.

مقدمه

گل مریم (*Polianthes tuberosa* L.) یک گیاه بومی مکزیک می‌باشد که به صورت تجاری برای تولید گل بریدنی پرورش می‌یابد و همچنین، در صنایع دارویی و عطرسازی به کار می‌رود. در حال حاضر، این گل به دلیل داشتن رایحه خوش از گل‌های پرطرفدار در کشور ایران می‌باشد. با وجود این اهمیت در بازار گلکاری، گل مریم از گوناگونی رنگ کمی برخوردار بوده و بیشتر رقم‌های تجاری آن در بازار گلکاری ایران و دنیا به رنگ سفید می‌باشند. از آنجایی که گوناگونی رنگ گل می‌تواند تاثیر به‌سزایی در جابجایی جایگاه بازارپسندی گل‌های بریدنی داشته باشد، تولید رنگ‌های نوین در گلبرگ‌های گل مریم همواره از زمینه‌های پژوهشی مورد علاقه پژوهشگران صنعت گلکاری بوده است.

در سال‌های اخیر به رویکردهای زیست‌فناورانه برای ارتقای سطح کمی و کیفی فراورده‌های زینتی توجه ویژه‌ای شده است. مجموعی از این رویکردها برای ایجاد یا تغییر در ویژگی‌های نوین مهم از دیدگاه باغبانی مانند عطر گل، رنگ گل، عمر پس‌برداشت، مقاومت به بیماری‌ها و تحمل در برابر تنش‌های نازیوا به کار رفته‌اند. در این بین، ایجاد رنگ‌های نوین یکی از هدف‌های اصلی بهنژادگران گیاهان زینتی بوده است. ایجاد رنگ‌های نوین در گل‌های زینتی به روش‌های سنتی مانند دورگه‌گیری بین گونه‌های یک جنس یا از راه انتقال ژن‌های موثر در تولید رنگ به کمک روش‌های نوین مهندسی ژنتیک و کشت بافت، امکان‌پذیر می‌باشد. در نتیجه، نخستین گام در تغییر رنگ گل از راه مهندسی ژنتیک، بهینه‌سازی شرایط کشت انواع بافت‌های گیاه مورد نظر می‌باشد. در گل مریم، Hutchinson و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از نفتالن‌استیک‌اسید (NAA) به همراه یک منبع سایتوکاینین مانند تیدیازورون (TDZ) یا بنزیل‌آمینوپیورین (BAP) تنها پینه‌زایی موفق را گزارش نمودند، اما این پینه‌ها باززایی نداشتند. در پژوهشی، Kahrizi و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که بافت دمگل بهترین ریزنمونه برای انگیزش پینه‌های رویان‌زا می‌باشد و بالاترین میزان پینه‌های رویان‌زا را روی محیط‌کشت موراشیگی و اسکوگ

IrHC2019

(MS) حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر ایندول-۳-استیک اسید (IAA) و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP به دست آوردند. در مطالعه Abdullah (۲۰۱۲)، ریزنمونه‌های برگی گل مریم که روی محیط‌کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA کشت شده بودند، به عنوان بهترین بافت گیاهی برای تولید پینه گزارش شدند. در مرحله بعد، رویان‌های بدنی از پینه زیرکشت شده روی محیط‌کشت MS تکمیل‌شده با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر توفوردی و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، باززایی شدند.

از آنجایی‌که جنس گل مریم از تنوع رنگ بالایی برخوردار نمی‌باشد و واردسازی گونه‌های رنگی موجود در برنامه‌های بهنژادی سنتی آن بسیار زمان‌بر و با برخی نتایج غیرقابل پیش‌بینی همراه می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که انتقال ژن‌های موثر در تولید رنگ به بافت‌های گیاهی گل مریم و بهینه‌سازی شرایط کشت‌بافت و باززایی برای آن‌ها، بهترین گزینه پیشنهادی برای ایجاد رنگ‌های نوین در این گل بریدنی مهم می‌باشد. از این رو، در این پژوهش شرایط رویان‌زایی بدنی غیرمستقیم در گل مریم از پینه‌های دمگل تکمیل و بهینه‌سازی شد تا به رویان‌های دوقطبی آماده تندش و تولید گیاهان کامل رسانده شود.

مواد و روش‌ها

به منظور تولید رویان‌های بدنی گل مریم، محیط‌کشت پایه موراشیگی و اسکوگ (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳۰ گرم در لیتر سوکروز و ۶ گرم در لیتر آگار به کار رفت که بسته به مرحله رشد و هدف آزمایش با تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف تکمیل شد.

غنچه‌های سالم و کامل رشد یافته از گیاهان مادری پرورش یافته در شرایط گلخانه جمع‌آوری شدند و به عنوان منبع ریزنمونه به کاررفتند. برای گندزدایی سطحی، ابتدا غنچه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ٪۷۰ و سپس به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ٪۱۰ غوطه‌ور گشتند. در پایان، غنچه‌ها سه بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند.

به منظور انگیزش پینه، دمگل‌ها از غنچه‌های سترون شده جدا شدند و درون ظرف‌های پتری روی محیط‌کشت موراشیگی و اسکوگ تکمیل شده با NAA به غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱ یا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر + 2,4-D به میزان صفر یا ۰/۵میلی‌گرم در لیتر + بنزیل‌آدنین (BA) به غلظت صفر یا ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کشت شدند. هر تیمار شامل ۴ تکرار بود. کشت‌ها در تاریکی و دمای ۱±۲۷ درجه‌سلسیوس قرار گرفتند.

برای پرآوری پینه‌های تولید شده و تبدیل آن‌ها به پینه‌های رویان‌زا، قطعه‌های پینه روی محیط‌کشت موراشیگی و اسکوگ دارای ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۵، ۱ یا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BA زیرکشت شدند. کشت‌ها در دمای ۱±۲۷ درجه‌سلسویس و رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی با تابش فعال نورساختی ۴۰ مایکرومول برمترمربع بر ثانیه رشد یافتند.

در پایان و به منظور بلوغ رویان‌های دو قطبی، پینه‌های رویان‌زای حاوی اندام‌های پیش‌رویان به محیط‌کشت‌های MS تکمیل‌شده با صفر، ۳۰، ۴۵ یا ۶۰ گرم در لیتر مالتوز (به همراه ۳۰ گرم در لیتر سوکروز به عنوان غلظت پایه در تمام غلظت‌های مالتوز) و صفر، ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم در لیتر ابسایزیک‌اسید (ABA) انتقال داده شدند.

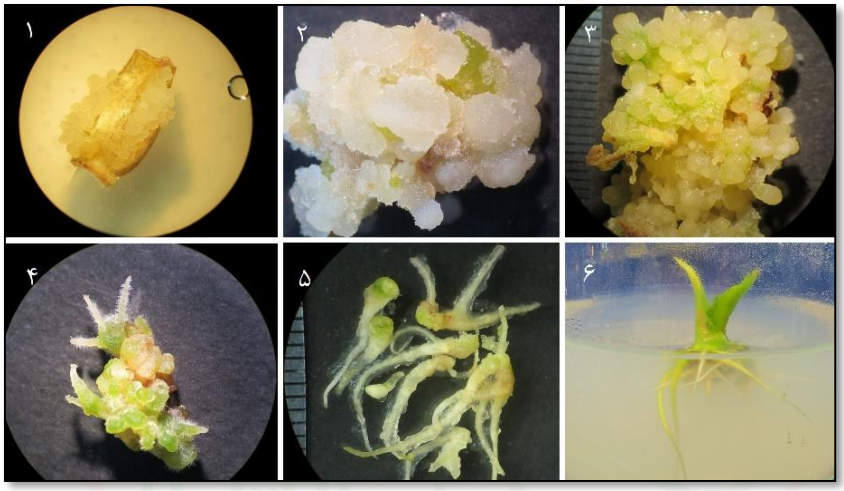
این پژوهش به صورت یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح به طور کامل تصادفی اجرا شد. به منظور واکاوی داده‌ها از نرم افزار SPSS 25 استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٪۵ انجام شد.

نتایج و بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که ریزنمونه دمگل در مقایسه با بافت برگ (نتایج آورده نشده‌اند)، بهترین بافت گیاهی برای پینه‌زایی گل مریم می‌باشد. این برتری از دید درصد انگیزش پینه، کیفیت پینه تولید شده، توانایی پرآوری و باززایی بعدی بود. این یافته با گزارش Kahrizi و همکاران (۲۰۰۸) همسو بود، اما با نتایج Abdullah (۲۰۱۲)، که ریزنمونه برگی را برتر یافتند، در یک راستا نیست که می‌تواند ناشی از تفاوت در نژادگان‌های به کار رفته باشد. همچنین، Carman (۱۹۹۰) بیان نمود که بافت‌های گلی به علت مرحله نموی خاص، می‌توانند برای رویان‌زایی بهتر باشند.

IrHC2019

بافت‌های برش‌خورده دمگل، پس از گذشت ۳۵ روز پینه‌زایی داشتند (نگاره ۱-۱). از میان تیمارهای مختلف، ریزنمونه‌های کشت شده روی محیط‌کشت حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، بالاترین درصد پینه‌زایی (۱۰۰٪) و باکیفیت‌ترین پینه‌ها (براساس بافت و رنگ) را تولید نمودند. هیچ یک از تیمارهای بدون 2,4-D، پینه‌زایی را نشان ندادند. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد 2,4-D در محیط‌کشت، یک پیش‌نیاز برای پینه‌زایی دمگل مریم در این پژوهش بود. در سایر پژوهش‌ها از دیگر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی اکسینی برای پینه‌زایی گل مریم استفاده شده است. برای نمونه، Kahrizi و همکاران (۲۰۰۸) غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و Abdullah (۲۰۱۲)، غلظت ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA را برای پینه‌زایی مناسب گزارش نموده‌اند. همچنین، Jala and Kachonpadungkitti (۲۰۱۴)، ترکیب NAA و BA را برای پینه‌زایی به کار بردند. تفاوت در غلظت‌ها و نوع تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به کار رفته در بیشتر پژوهش‌های کشت بافتی را می‌توان به تفاوت در شرایط رشد و نموی و نژادگانی گیاهان مادری منبع ریزنمونه نسبت داد که منجر به تغییر در میزان درون‌زای هورمون‌های گیاهی می‌شود. این تفاوت‌ها، در کاربرد برون‌زای تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی گوناگونی‌هایی را ایجاد می‌نماید.



نگاره ۱- مراحل رویان‌زایی بدنی غیرمستقیم از پینه‌های دمگل مریم. ۱) انگیزش پینه در بافت‌های دمگل ۳۵ روز پس از آغاز کشت؛ ۲) پرآوری پینه تولید شده با زیرکشت‌های پی‌درپی روی محیط کشت تکمیل‌شده با 2,4-D؛ ۳) تولید پینه‌های رویان‌زا حامل اندام‌های پیش‌رویانی و رویان کروی؛ ۴) مراحل ابتدایی بلوغ پیش‌رویان‌های کروی به رویان‌های کامل؛ ۵) تحریک رویان‌های دو قطبی بالغ به تندش؛ ۶) گیاهچه تولید شده از رویان بالغ که در حال تشکیل و تورم سوخ می‌باشد.

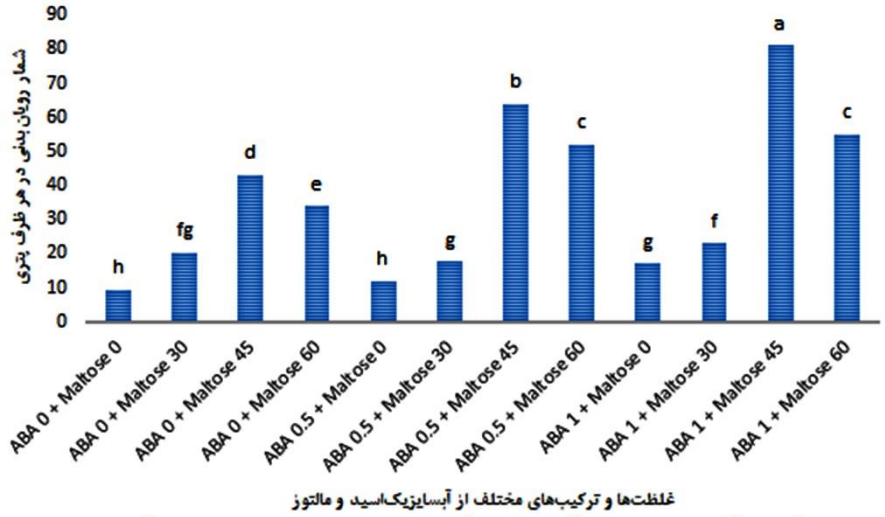
پینه‌های تازه تشکیل‌شده پس از زیرکشت روی محیط‌کشت تکمیل شده با ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA، بیشترین رشد (۵ برابر) را داشتند و منجر به تولید پینه‌های رویان‌زا شدند (نگاره ۲-۱). در کنار انگیزش پینه، همواره پرآوری یا رشد بعدی پینه و افزایش زیست‌توده آن از پیش‌نیازهای مهم برای تامین ماده گیاهی کافی به منظور تکمیل مراحل بعدی و باززایی رویان‌های بدنی می‌باشد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که کاربرد همزمان 2,4-D و BA بهترین تیمار برای افزایش رشد و حجم پینه‌های تشکیل‌شده بود. این یافته با نتایج پژوهش Haensch (۲۰۰۷) در یک راستا می‌باشد که ترکیب 2,4-D و BA را تنها راهکار برای افزایش رشد پینه حاصل از گونه‌ای از شمعدانی دانستند.

گزارش‌های بسیار اندکی از تولید موفق رویان‌های دوقطبی در گل مریم وجود دارد (Abdullah, 2012) و سایر پژوهش‌ها نیز یا تنها در مرحله تولید پینه‌های رویان‌زا و نه رویان‌های بدنی دوقطبی، متوقف شده‌اند (Hutchinson et al., 2004; Kahrizi et al., 2008) و یا به کلی اندام‌زایی غیرمستقیم از پینه‌ها (Jala and Kachonpadungkitti, 2014) را گزارش نموده‌اند. از این رو، در پژوهش حاضر با آزمون ترکیب‌های شیمیایی کارا از جمله تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مختلف و منابع کربوهیدراتی گوناگون در غلظت‌های توصیه‌شده بهینه‌سازی محیط‌کشت رویان‌زنی بدنی در گل مریم دنبال شد تا به رویان‌های بالغ دوقطبی دست یابیم. از این رو، پینه‌های رویان‌زایی که حامل اندام‌های پیش‌رویانی و رویان‌های کروی بودند (نگاره ۳-۱)، روی محیط کشت با غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف از ABA و مالتوز زیرکشت شدند. در نهایت، پینه‌هایی که

IrHC2019

تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر ابسایزیک‌اسید و ۴۵ گرم در لیتر مالتوز را دریافت داشتند، بیشینه شمار رویان‌های دوقطبی (۸۱) را در هر پتری‌دیش باززایی نمودند (نگاره ۲) که پس از زیرکشت شروع به تندش نمودند (نگاره ۴-۱ تا ۶-۱). به طور کلی ABA در همزمان‌سازی رویان‌زایی بدنی و بلوغ آن‌ها همسان با آنچه Alwael و همکاران (۲۰۱۷) در نخل خرما گزارش کردند، دخالت داشت. همچنین، Akula و همکاران (۲۰۰۰) کاربرد ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر ABA را به همراه بتائین، محرک مناسبی برای رویان‌زایی بدنی در گیاه چای (*Camellia sinensis*) گزارش نمودند. افزون بر این، منابع کربوهیدراتی گوناگون نیز تاثیر به سزایی بر پیشرفت مرحله‌های روان‌زایی بدنی دارند. در پژوهشی، Ganesan و Jayabalan (۲۰۰۵) گزارش نمودند که ۳۰ گرم در لیتر مالتوز بهترین منبع کربنی برای انگیزش پینه‌های رویان‌زا در پنبه بود و نیز ۳۰ گرم در لیتر گلوکوز برای بلوغ رویان‌های بدنی بسیار کارا بود. از این رو، مشخص می‌شود که ABA و مالتوز تیمارهای سودمندی برای تشکیل و بلوغ رویان‌های بدنی در گیاهان می‌باشند که یافته‌های پژوهش حاضر نیز بر این موضوع تاکید دارد.

در پایان و براساس یافته‌های این پژوهش، می‌توان کاربرد دو تنظیم‌کننده رشد گیاهی توفوردی و ابسایزیک اسید را در کنار منبع کربوهیدارتی مالتوز به عنوان تیمارهای کلیدی در تولید رویان‌های دو قطبی گل مریم توصیه نمود.



نگاره ۲- تاثیر غلظت‌ها و ترکیب‌های مختلف از ابسایزیک‌اسید و مالتوز بر شمار رویان بدنی باززایی شده از پینه‌های دمگل گل مریم کشت شده روی محیط‌کشت پایه موراشیگی و اسکوگ.

منابع

Abdullah, S. 2012. Somatic embryogenesis and regeneration of *Polianthes tuberosa* L. (Doctoral dissertation, Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, Kuala Lumpur).

Alwael, H. A., Naik, P. M. and Al-Khayri, J. M. 2017. Synchronization of somatic embryogenesis in date palm suspension culture using abscisic acid. In *Date Palm Biotechnology Protocols Volume I* (pp. 215-226). Humana Press, New York, NY.

Carman, J. G. 1990. Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 26(8): 746-753.

Ganesan, M. and Jayabalan, N. 2005. Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, *Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2 through suspension cultures. Indian Journal of Experimental Biology, 43: 921-925.

Haensch, K. T. 2007. Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium* x *domesticum* cv. Madame Layal. Electronic Journal of Biotechnology, 10(1): 69-77.

Hutchinson, M. J., Onamu, R. and Obukosia, S. 2004. Effect of thidiazuron, benzylaminopurine and naphthalene acetic acid on *in vitro* propagation of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) from shoot tip explants. Journal of Agriculture, Science and Technology, 6(1): 48-59.

Kahrizi, D., Barzegar, B. and Azadi, P. 2008. Study on somatic embryogenesis in *Polianthes tuberosa*. Journal of Biotechnology, (136), S150.

IrHC2019

Induction of somatic embryos in tuberose

Ali Pourkhaloee[1]*, Morteza Khosh-Khui[2]
[1*] Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan.
[2] Professor, Department of Horticultural Science, Shiraz University, Shiraz.
Corresponding Author: alipourkhaloee@vru.ac.ir

Abstract

Tuberose is one of the most important ornamental plants that creation of new flower colors in it via genetic engineering is of interest. After genetic transformation, indirect somatic embryogenesis is one of the important methods for *in vitro* plantlet regeneration of manipulated plants. In the present research, pedicels of *Polianthes tuberosa* L. were cultured on Murashige and Skoog basal medium containing different plant growth regulators, depending on the growth stage and the purpose of experiment, to induce embryogenic calluses. After 35 d of cultures, callus initiation at the cut edges of the pedicels was observed. The highest percentage of callus induction (100%) and calluses of the highest quality (based on texture and color) were obtained on MS medium containing 0.5 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 0.5 mg/L naphthaleneacetic acid (NAA). Induced calluses showed the highest proliferation rate (5-fold increment) by subculturing on MS medium supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BA. Finally, calluses that received a combination of 1 mg/L abscisic acid (ABA) and 45 g/L maltose produced the maximum number of bipolar somatic embryos (81) per each petri dish. Based on the findings of this investigation, application of 2,4-D and ABA along with the use of maltose as a suitable carbon source is recommended for production of bipolar somatic embryos in tuberose.

***Keywords*:** Abscisic acid (ABA), Maltose, Tissue culture, 2,4-D.

IrHC2019