بررسی رویان‌زایی از بافت نوسل انبه رقم محلی چارک در شرایط درون شیشه‌ای

سیدمحمد شتاب بوشهری[1*]، روزبه عباس زاده[2] و سید علی قائم مقامی[3]

[1*] کارشناس ارشد پژوهشی گروه تولیدات گیاهی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.

[2] استادیار گروه فناوری‌های پس از تولید، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.

[3] مربی گروه تولیدات گیاهی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.

*نویسنده مسئول: shetab8@yahoo.com

چکیده

یکی از روش‌های تکثیر غیرجنسی انبه ریزازدیادی آن است که هرچند امکان استفاده تجاری از آن ممکن است هنوز مقرون‌به‌صرفه نباشد اما می‌تواند در بررسی‌های اصلاحی خصوصاً انتقال ژن مورد استفاده واقع گردد. در این پژوهش رویان‌زایی انبه رقم محلی چارک توسط بافت نوسل (خورش) میوه مورد بررسی قرار گرفت. میوه های نارس انبه، ۴۰- ۴۵ روز بعد از گرده‌افشانی جمع‌آوری‌شده و پس از ضدعفونی سطحی و استخراج بافت نوسل از تخمدان، روی محیط کشت MS تغییر یافته با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در لیتر از هورمون 2,4-D برای بدست آوردن پیش کالوس‌های جنین‌زا کشت شدند. پس از یک ماه، تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D باعث تولید پیش‌کالوس‌های جنین‌زا شد که مناسب‌ترین غلظت برای تولید پیش‌کالوس‌های جنین‌زا نیز بود. این کالوس ها به روی محیط کشت تغییر یافته B_5 با تیمار هورمونی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BPA برای بلوغ رویان‌ها منتقل و به مدت یک ماه نگهداری شدند. رویان‌ها جوانه زدند و در محیط کشت تغییر یافته B_5 مایع و نیمه جامد بدون هورمون تا تشکیل تدریجی ساقه، برگ و ریشه نگهداری و در هر دو نوع محیط کشت، گسترش اندام‌ها مشاهده گردید.

کلمات کلیدی **: کالوس‌های پیش جنین‌زا، خورش، بلوغ رویان، ریزازدیادی.**

مقدمه

انبه *Mangifera indica* L. متعلق به خانواده Anacardiaceae است. براساس گزارشات FAO سازمان خواروبار کشاورزی ملل متحد انبه مهم‌ترین میوه قاره آسیا است و بعد از موز، مرکبات، انگور و سیب پنجمین میوه مهم دنیا از نظر میزان تولید می‌باشد. در ایران اکثر باغات قدیمی حاصل از کشت بذر بوده ولی اخیراً استفاده از روش‌های تکثیر غیرجنسی در احداث باغات رو به گسترش می‌باشد. یکی از روش‌های تکثیر غیرجنسی، ریزازدیادی است. گر چه در ایران مرسوم‌ترین روش ازدیاد غیر جنسی پیوند بر روی پایه‌های بذری است (Saboki and Habibifar, 2001) اما امروزه استفاده از تکنیک کشت بافت خصوصاً رویان‌زایی بدنی در بسیاری از منابع برای انبه گزارش شده هر چند امکان استفاده تجاری از آن برای تکثیر انبه هنوز کاملاً به اثبات نرسیده لیکن کشت بافت انبه می‌تواند در بررسی‌های سلولی مولکولی و اصلاحی خصوصاً انتقال ژن مورد استفاده واقع گردد (Pateña and Barba, 2011; Ram, 1997).

جنین زایی غیرجنسی از بافت‌های خورش (Nucell) توسط لیتز (Litz, 1984) برای ارقام تک جنینی و چندجنینی انبه گزارش شد. او ثابت کرد در هر دو نوع انبه، جنین‌زایی غیرجنسی رخ می‌دهد اما پتانسیل تولید و گسترش جنین‌ها بستگی به رقم انبه دارد. او در محیط کشت نیمه جامد حاوی نمک‌های MS با ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین، ۶۰ گرم در لیتر ساکاروز و ۸ گرم در لیتر آگار و ۱-۲ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کالوس‌های جنین‌زا را تولید و نگهداری کرد. دیوالد و همکاران (Dewald *et al.*, 1989a and 1989b) بعداً محیط کشت مذکور را اپتیمم کرده و از محیط کشت تغییر یافته B5 با نمک‌های پرمصرف B5 و نمک‌های کم‌مصرف و ترکیبات ارگانیک MS بعلاوه ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D که با ۸ گرم در لیتر از ماده ژل کننده (Gellan gum) نیمه جامد شده بود، استفاده کردند. آن‌ها برای پرآوری و نگهداری توده‌های کالوسی پیش جنینی ایجاد شده از همان محیط کشت به صورت نیمه جامد و یا مایع (بدون ماده ژل

کننده) استفاده کرده و نتیجه گرفتند که نوع ماده نیمه جامد کننده و وضعیت فیزیکی محیط کشت (مایع، نیمه جامد) و نوع ازت (ارگانیک، معدنی) در میزان موفقیت جوانه‌زنی نرمال مؤثرند و برای تشکیل ریز لپه‌ها و بلوغ جنین‌ها باید 2,4-D از محیط کشت حذف می‌شد. در این پژوهش استفاده از رویان‌زایی بدنی در بافت نوسل انبه رقم چارک برای ایجاد و تشکیل ریشه و اندام‌های رویشی هوایی در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

میوه‌های نارس انبه رقم چارک، ۴۰- ۴۵ روز بعد از گرده‌افشانی از روستای تنبانو میناب جمع‌آوری و میوه‌های با قطر ۳/۵- ۴/۵ سانتیمتر انتخاب و پس از ضدعفونی سطحی با محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. توده جنینی (Embryo Mass) یعنی جنین، لپه‌ها و نوسل اطراف آن‌ها را با شکاف طولی میوه‌های نارس، تحت شرایط استریل خارج نموده و پس از حذف لپه‌ها و جنین، نوسل‌های جدا شده از محل برش نخورده روی محیط کشت نیمه جامد کشت شدند.

ریزنوسل‌های کشت شده در روی محیط کشت به‌سرعت مواد فنولی از خود ترشح می‌کنند. استفاده از مواد جاذب مانند زغال فعال و یا پلی وینیل پیرولیدون (PVP) به دلیل جذب 2,4-D محیط کشت و نتیجتاً کاهش تأثیرات آن، صرف‌نظر گردید. لذا برای جلوگیری از اثرات نامطلوب این مواد، هر۲-۳روز یک بار ریز نمونه‌ها به محیط کشت جدید منتقل شده و پس از ۲-۳ واکشت، ترشح مواد فنولی از ریزنمونه‌ها کاهش یافت. فتوپریود اتاقک رشد برای دوره روشنایی ۱۶ ساعت و تاریکی ۸ ساعت تنظیم شده بود.

هورمون 2,4-D در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲ و۳ میلی‌گرم در لیتر به محیط کشت پایه MS تغییر یافته (Litz, 1984) اضافه شده و نوسل‌های انبه چارک بر روی آن‌ها کشت شدند. محیط کشت MS تغییر یافته شامل نصف مقدار عناصر کم‌مصرف و عناصر پرمصرف محیط کشت MS (ماکرو و میکروالمنت‌های MS) به‌علاوه ۰/۴ میلی‌گرم در لیتر تیامین، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و۶۰ گرم در لیتر ساکاروز بود که اسید اسکوربیک آن حذف و برای نیمه جامد کردن به‌جای دیفکو باکتو آگار از ۲ گرم در لیتر فیتاژل استفاده شد. pH محیط‌ها قبل از اتوکلاو کردن روی ۵/۸ تنظیم شد. در نهایت تعداد سه نوسل درهر شیشه در نظر گرفته شده و پس از یک ماه درصد کالوس‌دهی هر قطعه نوسل یادداشت‌برداری و میانگین آن‌ها در هر شیشه به‌عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. تیمار بدون هورمون نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته و به‌این‌ترتیب تعداد ۱۰ تکرار برای هر تیمار غلظت هورمونی در نظر گرفته و داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند و تجزیه واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۱٪ انجام گرفت.

کالوس‌های رویان‌زای به دست آمده از تیمار یک میلی‌گرم در لیتر 2,4-D به محیط‌های کشت جدید، B5 تغییر یافته (Dewald *et al.*, 1989b) شامل عناصر پرمصرف B5 (ماکروالمنت‌های B5)، عناصر کم‌مصرف MS (میکروالمنت‌های MS)، ویتامین‌های MS بدون شیره نارگیل و کازیین، ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوتامین و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۲ گرم در لیتر فیتاژل و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر هورمون BPA[1] منتقل شدند. رویان‌های بدنی تشکیل شده جهت رشد بعدی به محیط کشت تغییر یافته B5 جامد و مایع فاقد هورمون منتقل شده و شیشه‌های حاوی محیط کشت مایع روی دستگاه شیکر با سرعت ۸۰ rpm نگهداری شدند.

نتایج و بحث

کالوس‌های رویان‌زا مراحل رویان‌زایی را به‌تدریج از گلبولار تا رویان‌های کامل دولپه‌ای طی کرده (شکل۲) و در این میان رویان‌های تک، دو و یا چند لپه‌ای نیز مشاهده شد (شکل۳). نگهداری طولانی مدت امبریوئیدها در محیط‌کشت هورمون دار (سیتوکینینی) باعث شد تا لپه‌ها در آینده حجیم شده و حتی تا قطر ۳/۵ سانتیمتر نیز رشد کنند (شکل۴-a). جوانه‌زنی و رشد بعدی اندام‌ها (ریشه، ساقه و برگ) در محیط کشت نیمه‌جامد و هم مایع دیده شد (شکل۴– b و d). زمان بلوغ و جوانه زنی بسیار تدریجی بوده و ۲ تا ۳ ماه طول کشید. ریزلپه‌های بالای یک سانتیمتر در محیط مایع و روی شیکر با سرعت rpm

[1]- N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)adenine

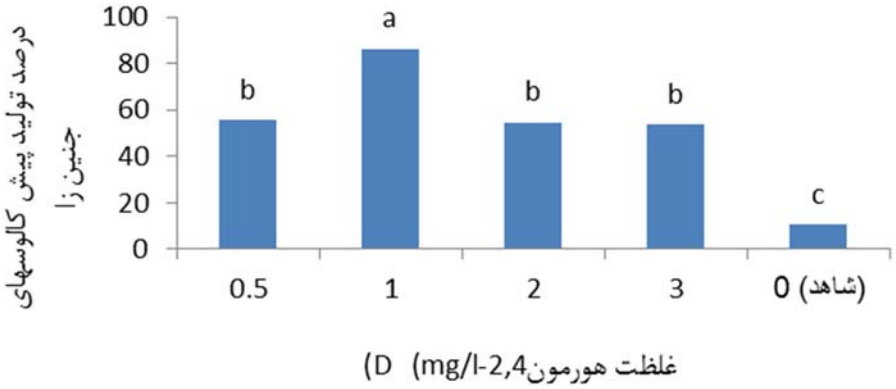
۸۰ به‌سرعت بالغ شده و رشد کردند و نمونه‌های کوچک‌تر در محیط کشت نیمه جامد به‌کندی رشد و بلوغ خود را ادامه دادند (شکل۴- a وc).

در آزمایش نخست با توجه به جدول (۱) و شکل (۱) مشاهده می‌شود که تیمار هورمونی 2,4-D برای تولید کالوس‌های پیش رویان‌زا لازم بوده و تفاوت معنی‌دار و اختلاف زیاد بین میانگین‌های تیمارها و شاهد نیز در تأیید این موضوع می‌باشد. تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D بهترین تیمار است که با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد. لذا از کالوس‌های این تیمار برای رشد و گسترش بعدی استفاده شد. درصد پایین تولید کالوس در شاهد حاکی از ضرورت وجود هورمون 2,4-D برای تولید کالوس رویان‌زا است که مشابه با نتیجه تحقیقات دیوالد و همکاران (Dewald *et al.*, 1989a) می‌باشد.

جدول۱- تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف غلظت هورمون 2,4-D روی درصد تولید پیش کالوس‌های رویان‌زای انبه چارک

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	Sig
بین تیمارها	۴	۲۸۹۸۳/۴۸	۷۲۴۵/۸۷	۱۳/۶۸۴	۰/۰۰۰
درون تیمارها	۴۵	۲۳۸۲۷/۵	۵۲۹/۵		

در مورد اثر هورمون‌های سایتوکینینی BA (بنزیل آدنین)، Kin (کینتین) و هورمون GA_3 (جیبرلین) در تکامل و بلوغ بعدی رویان‌ها گزارش‌هایی از آرا و همکاران (Ara *et al.*, 2004)، دورا و همکاران (Deore *et al.*, 2000)، چاتورودی و همکاران (Chaturvedi *et al.*, 2004) و توماس (Thomas, 1999) ارائه شده است اما در مورد هورمون BPA گزارشی تاکنون مشاهده نگردید.

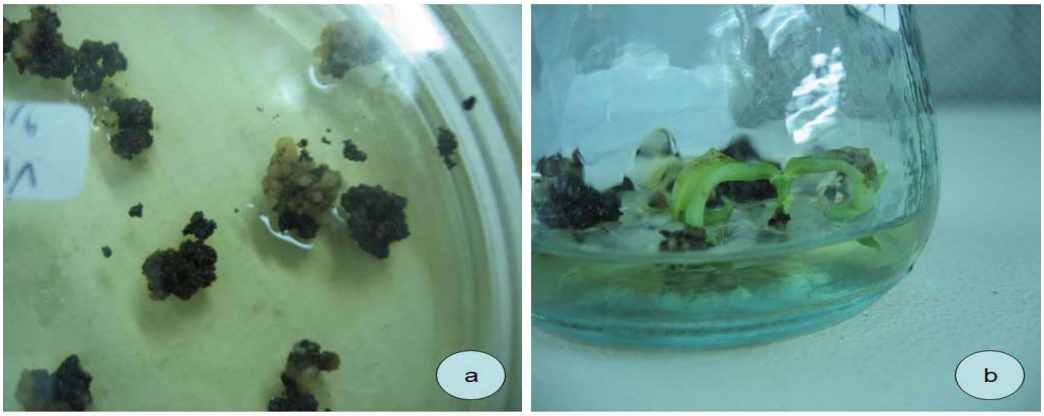


شکل ۱- نتایج مقایسه تیمارها با روش آزمون دانکن

نکته مهم، وجود درصد قابل توجهی (۱۰٪/۵) از تولید کالوس‌های جنین زا در تیمار شاهد (بدون هورمون) می‌باشد که این موضوع نشان دهنده توانایی جنین زایی اندام نوسل انبه لااقل در برخی ارقام است که البته به‌طور طبیعی در ارقام با بذور چند جنینی (جنین‌های غیرجنسی) به وجود می‌آیند. لیتز (Litz, 1984) به اهمیت حضور 2,4-D در مرحله اول و عدم حضور آن در مرحله دوم به‌عنوان عامل اصلی رویان‌زایی و تولید کالوس‌های رویان‌زا اشاره نموده همچنین توماس (Thomas, 1999) نیز اهمیت 2,4-D را در تحریک به رویان‌زایی عنوان کرده است.

سپاسگزاری

از همکاری صمیمانه مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان میناب به‌ویژه آقای مهندس سید محمود طالبی برای تهیه نمونه های گیاهی و همچنین پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران برای در اختیار گذاشتن آزمایشگاه کشت بافت گیاهی، تشکر و قدردانی می‌شود.



شکل ۲- رویان‌های حاصل از کالوس‌های جنین‌زای انبه چارک: a مرحله گلبولاری شکل، b یک رویان دولپه‌ای بالغ

شکل۳- a یک رویان چند لپه‌ای. b یک رویان نرمال دولپه‌ای. c یک رویان تک‌لپه‌ای.
(عکس‌ها توسط بینوکولار با بزرگنمایی 4x)

شکل۴- بلوغ و جوانه‌زنی رویان‌ها : a – یک رویان بالغ در محیط کشت مایع، b – گیاهچه رشد کرده در محیط کشت مایع، c – رویان جوانه‌زده در محیط کشت نیمه جامد، d – گیاهچه رشد کرده در محیط کشت نیمه جامد.

منابع

Ara, H., Jaiswal, U. and Jaiswal, V.S. 2004. An improved method of proliferation of proembryogenic calluses of *mangifera indica* L. var. Amrapali for scale-up of somatic embryo production. Indian Journal of Biotechnology; 3(2), 229-234.

Chaturvedi, H.C., Agnihotri S., Sharma, M., Sharma, A.K., Jain, M., Gupta, P., Chourasia, A. and Kidwai, N.R. 2004. Induced nucellar embryogenesis in vitro for clonal multiplication of *mangifera indica* L. var. Ambalavi a dwarfing root stock. Indian Journal of Biotechnology; 3(2), 221-228.

Deore, A.C., Chavan, S.S., Ranade, R.S. Deshpande, R.S. and Dhonukshe, B.L. 2000. Factors affecting invitro somatic embryo from nucellar tissue of Alphonso mango. Annuals of plant physiology; 14(2), 182-186.

Dewald, S.G., Litz, R.E. and Moore, G.A. 1989a. Optimizing somatic embryo production in mango. Journal of the American Society for Horticultural Science; (114), 712-716.

Dewald, S.G., Litz, R.E. and Moore, G.A. 1989b. Maturation and germination of mango somatic embryos. Journal of American Society for Horticultural Science; 114, 837-841.

Litz, R.E. 1984. In vitro somatic embryogenesis from nucellar callus of monoembryonic *mangifera indica* L.. Hortscience; 19, 715-717.

Pateña, L. F., Barba, R. C., 2011. The development of techniques for tissue culture of mango (*Mangifera indica* L.) var. Carabao and successful transfer of ex vitro-grafted plants to soil and the field. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant. 47:629–636.

Ram, S. 1997. Propagation. In: Litz, R. E. (ed.) The Mango; Botany, Production and Uses. CAB International, Wallingford, Oxon, pp 363-400.

Saboki, A., Habibifar, S. 2001. Review and determine the best time and method of the mango Grafting in Sistan and Baluchestan Bahu Kalat. Report design; pp. 15, (in Persian).

Thomas, P. 1999. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucellar tissue of monoembryonic mango. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 74, 135-139.

Investigation on Somatic Embryogenesis in Mango Nucellar Tissue Charak Variety *In Vitro*

S. M. Shetabboushehri[1*], R. Abbaszadeh[2], S. A. Ghaemmaghami[3]

[1] M.Sc. Horticulture, Department of Plant production group, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran.

[2] Assistant Professor, Dept. of Biosystems Engineering, Iranian Research Organization for Science &Technology (IROST), Tehran, Iran.

[3] Scientific members of Plant production group, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran.

[*]*Corresponding Author: shetab8@yahoo.com*

Abstract

It is possible to commercially use micropropagation for mango asexual propagation but it can be applied for breeding studies especially for genetic engineering. In this research, micropropagation of mango (Charak variety) through somatic embryogenesis from nucell tissues was studied. Immature fruits were collected 40-45 days after pollination and their surface were sterilized. The nucellus was separated from each ovule and cultured on modified MS medium with difference 2, 4-D treatments (0, 0.5, 1, 2 and 3 mg/l) to obtain proembryogenic callus. 1mg/l 2, 4-D treatment was the best for proembryogenic callus induction after one month. Proembryogenic calluses were cultured on media containing 0.5 mg/l BPA to initiate embryos. After one month, embryos were maturated and then germinated and gradually developed to plantlet with stem, leaf and root on liquid and semisolid B5 medium without hormone.

***Keywords*: Proembryogenic calluses, Nucell, Maturation embryos, Micropropagation.**