القای کالوس از ریز نمونه بذر بالغ در Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.)

فهیمه سادات سجادی[۱*]، مینا تقی‌زاده، عبدالله خدیوی خوب، بابک ولی‌زاده کاجی[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح و فیزیولوژی گل و گیاهان زینتی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

[۲] استادیار و هیئت‌علمی گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک

*نویسنده مسئول: f-sajadi@msc.araku.ac.ir

چکیده

کنتاکی بلوگرس یکی از گونه‌های مهم چمن فصل سرد و مورد استفاده در مخلوط چمن اسپورت است. این پژوهش به‌منظور بررسی القای کالوس از ریزنمونه بذر بالغ در کنتاکی بلوگرس انجام شد. انگیزش کالوس در محیط کشت پایه MS به همراه دو اکسین مختلف شامل 2,4-D (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) و NAA (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌تنهایی و یا در ترکیب با دو غلظت صفر و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر BA بررسی شد. در نهایت نتایج حاکی از آن بود که اثر غلظت‌های مختلف 2,4-D و BA تفاوت معنی‌داری در انگیزش کالوس و باززایی وجود نداشت در حالی که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بین غلظت‌های مختلف NAA و برهمکنش بین NAA و BA وجود داشت و بیشترین میزان انگیزش کالوس در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد.

***کلمات کلیدی*: انگیزش، باززایی، تنظیم‌کننده‌های رشد، چمن،محیط کشت.**

مقدمه

کنتاکی‌بلوگرس (*Poa* pratensis L.) یکی از چمن‌های چندساله فصل سرد است (Bashaw *et al*., 1987). تکثیر ارقام با استفاده از اصلاح سنتی در این جنس بهبود یافته است، اگرچه با دشواری‌هایی به دلیل روش تکثیر آپومیکسی اختیاری در این گونه مواجه شده است (Kirsten *et al*., 1993). استفاده از بیوتکنولوژی در اصلاح ارقام مختلف کنتاکی تاکنون کارآمد بوده و از این روش برای سایر گونه‌ها نیز پیشنهاد شده است (Johnson & Riordan, 1999). کشت درون شیشه‌ای نیز یکی از روش‌های کارآمد می‌باشد. تحقیقات گسترده در زمینه بیوتکنولوژی و کشت بافت منجر به شناسایی چندین روش برای باززایی ارقام و ژنوتیپ‌های چمن از بذور بالغ (Griffin & Dibble,1995; Ke & Lee, 1996; Van der Valk *et al*., 1989)، گل‌آذین (Van der Valk *et al*., 1989)، کشت سوسپانسیون (Nielsen & Knudsen, 1993) و کشت پروتوپلاست (Nielsen *et al*., 1993) شده است. میزان باززایی از ریزنمونه گل‌آذین بیش از بذور بالغ است (Van der Valk *et al*., 1989). گل‌آذین‌های نابالغ ریز نمونه مناسبی هستند (Vander Valk *et al*., 1989) ولی تنها برای یک مدت کوتاه در زمان گل‌دهی (در دمای ۴ تا ۱۰ درجه سانتی‌گراد و تحت روزکوتاه) در دسترس‌اند و بهترین زمان برداشت گل به‌منظور تهیه ریزنمونه کمتر از یک هفته است، درحالی‌که بذور تمام سال در دسترس بوده و به فصل محدود نمی‌شوند. در گزارش حاضر، کالوس‌زایی چمن بلوگرس با استفاده از بذور بالغ به‌عنوان ریزنمونه با غلظت‌ها و ترکیبات مختلف اکسین و سایتوکینین در سیستم کشت درون شیشه‌ای بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک در سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. به‌منظور ضدعفونی بذورگونه چمن Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) ابتدا بذرها در الکل ۷۰ درصد به

مدت دو دقیقه و سپس هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شده و در ادامه سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. بذور مورد نظر بر روی محیط کشت جوانه‌زنی حاوی آب مقطر و ۸ گرم بر لیتر آگار، برای جوانه‌زنی قرار گرفتند. پس از دو تا سه هفته از رشد گیاهچه‌ها، ریزنمونه‌های هیپوکتیل به قطعات ۵ میلی‌متر جدا شده و بر محیط کشت پایه MS دارای ۳۰ گرم بر لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و غلظت‌های مختلف2,4-D (صفر، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌تنهایی و یا در ترکیب با دو غلظت مختلف BA (صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) جهت انگیزش کالوس کشت شدند. pH محیط کشت نیز ۵/۸ تنظیم شد و برای تنظیم آن از NaOH و HCl استفاده گردید. بذور پس از کشت در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. در نهایت میزان انگیزش کالوس و باززایی بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با چهار تکرار انجام شد. پس از انجام آزمون نرمالیته و نرمال‌سازی، داده‌ها حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و توسط همین نرم‌افزار و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

کنتاکی بلوگرس یکی از گونه‌های چمنی مهم با تولیدمثل آپومیکس اختیاری است. تکثیر این گیاه از طریق کشت درون شیشه‌ای همواره با مشکلات و محدودیت‌هایی روبرو است. همچنین اگرچه تاکنون تحقیقات مختلفی در راستای تکثیر این گونه در شرایط درون شیشه‌ای صورت گرفته است ولی گزارش‌های اندکی در ارتباط با القای کالوس از ریزنمونه‌های مختلف این گونه مهم گیاهی وجود دارد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های 2,4-D و BA به‌تنهایی و یا در ترکیب باهم اثر معنی‌داری بر انگیزش کالوس و باززایی گیاه از کنتاکی بلوگرس نداشت (جدول ۱)، ولی غلظت‌های NAA و BA به‌تنهایی و یا در ترکیب باهم در سطح یک درصد اثر معنی‌داری بر انگیزش کالوس داشت (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر BA و 2,4-D بر القای کالوس و باززایی گیاه از kentuky bluegrass (*Poa pratensis* L.)

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کالوس‌زایی	باززایی
BA	۱	۰/۷۱ ns	۰/۰۳ ns
2,4-D	۲	۰/۳۰ ns	۰/۰۳ ns
BA × 2,4-D	۳	۰/۰۳ ns	۰/۰۶ ns
خطای آزمایش	۱۸	۲/۷۹	۲/۳۰

ns عدم معنی‌داری در سطح آماری یک درصد و پنج درصد

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر BA و NAA بر القای کالوس و باززایی گیاه از kentuky bluegrass (*Poa pratensis* L.)

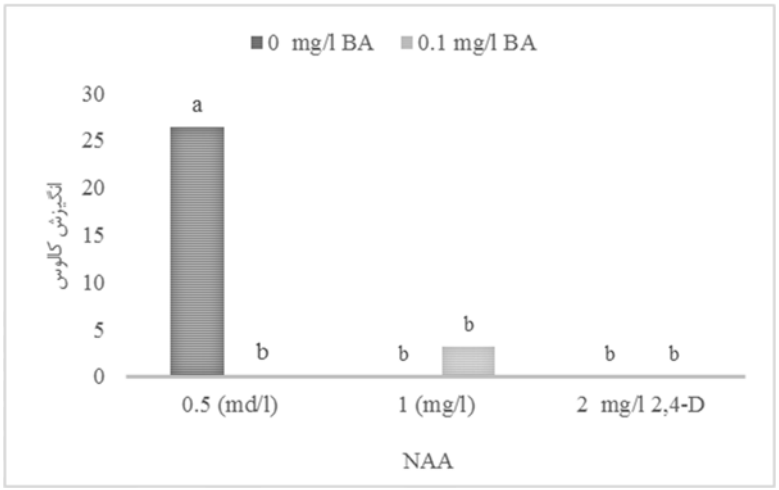
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		کالوس‌زایی
BA	۱	۸/۸۳ **
NAA	۲	۱۰/۹۴ **
BA × NAA	۳	۱۵/۱۶ **
خطای آزمایش	۱۸	۱۰/۷۳

** معنی‌دار در سطح آماری یک درصد

بر اساس نتایج حاصل این پژوهش می‌توان گفت که استفاده از ترکیب اکسینی 2,4-D تأثیر منفی بر القای کالوس داشته است و استفاده از آن منجر به عدم القای کالوس می‌شود. استفاده ترکیبی از 2,4-D همراه با بنزیل‌آدنین پورین نیز نتوانست منجر به القای کالوس گردد این درحالی بود که استفاده نفتالین استیک اسید منجر به بهبود کالوس زایی گردید (نمودار ۱). استفاده از ترکیبات اکسینی به‌منظور القای کالوس در گیاهان مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و نتایج گزارش‌های پیشین نشان می‌دهد که برای کالوس‌زایی بیش‌تر بهتر است از ترکیبات مختلف اکسینی استفاده گردد. اکسین‌ها برای بالا بردن توانایی تشکیل کالوس شناخته شده‌اند و اغلب در محیط انگیزش کالوس در کشت بافت گیاه استفاده می‌شوند. یکی از منابع مهم برای تولید اکسین طبیعی در گیاهان، بذور در حال رشد است (Arteca, 1996). بنابراین، به دلیل کافی بودن سطوح هورمون اکسین در داخل بافت‌ها، کالوس‌زایی در غلظت‌های زیاد اکسین خارجی کم‌تر است. بیش‌تر پژوهش‌های صورت گرفته تاکنون بر روی القای کالوس از ریزنمونه‌های مختلف چمن مربوط به ترکیبات 2,4-D، نفتالین‌استیک اسید، ایندول بوتیریک‌اسید، دیکامبا[1] و غیره می‌باشد. نتایج آزمایش حاضر نشان داد استفاده از نفتالین استیک اسید برتری خاصی نسبت به 2,4-D داشت و بالاترین میزان کالوس زایی (۴۲ درصد) زمانی حاصل شد که از نفتالین‌استیک اسید به‌تنهایی استفاده شده بود؛ این در حالی است که نتایج آزمایش‌های پیشین نشان می‌دهد استفاده از 2,4-D می‌تواند بهتر از سایر ترکیبات اکسینی باشد (Wang et al., 2010; Lee et al., 2011) به طوری‌که نتایج پژوهش‌های Lee و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که استفاده از توفوردی نسبت به دو ترکیب نفتالین استیک اسید و دیکامبا تأثیر بیش‌تری بر القای کالوس، تعداد توده کالوسی و وزن کالوس‌ها داشت. تأثیر بهتر 2,4-D نسبت به نفتالین استیک اسید و حتی دیکامبا احتمالاً به خاطر پایداری بیشتر آن در محیط کشت می‌باشد. افزایش غلظت اکسین تأثیر منفی بر القای کالوس داشت ولی نتایج آزمایش‌های محققین قبلی حاکی از آن بود که استفاده از غلظت‌های بالای اکسین منجر به افزایش میزان کمی و کیفی کالوس می‌شود ولی افزایش بیش از حد آن تأثیر نامطلوبی بر کالوس زایی خواهد داشت (Ahn *et al*., 1987; Valk *et al*.,1989; Artunduaga *et al*., 1989; Jackson and Dale, 1989; Chaudhury and Qu, 2000; Wang *et al*., 2002; Takahashi *et al*., 2002; Li and Qu, 2002; Goldman *et al*., 2004; Jian *et al*., 2005; Cao *et al*., 2006; Salehi *et al*., 2008).

استفاده از بنزیل آدنین به همراه نفتالین استیک اسید منجر به کاهش کالوس زایی شد و مقدار کالوس زایی هنگامی‌که از نفتالین‌استیک اسید به‌تنهایی استفاده شده بود، به‌مراتب بیش از زمانی بود که این دو ترکیب به همراه هم استفاده شده بودند. BA جزء سیتوکینین‌های مصنوعی می‌باشد که یکی از فعال‌ترین و ارزان‌ترین سیتوکینین‌ها محسوب می‌گردد. سطوح این سیتوکینین در بذر کم‌تر می‌باشد و بنابراین نیاز مصرف هورمون خارجی آن را در محیط بیش‌تر می‌نماید. منابعی نیز در دسترس است که اثر تحریکی سیتوکینین‌های خارجی را در مرحله جذب آب بذور برای جوانه زدن در شرایط برون شیشه‌ای را تأیید می‌نماید. به‌طورکلی سیتوکینین‌ها در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی در گیاهان بسیار نقش دارند (Arteca, 1996). گروهی از محققین نیز حضور غلظت‌های کم BA به همراه اکسین را در محیط کالوس‌زایی چمن‌ها تأیید نمودند از جمله Qu *et al*., 2001 (رایگرس)، Chaudhury and Qu, 2000 (برموداگرس)، Qu *et al*.,2006 (سنت آگوستین گرس)، Bradley, 2001 (رایگرس) و Taghizadeh , 2012 (برموداگرس) که با نتایج ما هم‌راستا نبودند.

[1]Dicamba



نمودار ۱- مقایسه میانگین اثر BA و NAA بر انگیزش کالوس از kentuky bluegrass (*Poa pratensis* L.)

منابع

Ahn, B.J., Huang, F.H., and King, J.W., 1987. Regeneration of Bermuda grass cultivars and evidence of somatic embryogenesis. Crop Science. 27: 594-597.

Arteca, R. 1996. Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall.

Artunduaga, I.R., Taliaferro, C.M., and Johnson, B.J., 1989. Induction and growth of callus from immature inflorescences of "ZEBRA" bermudagrass as affected by casein hydrolysat and 2, 4-D concentration. *In Vitro* Cellular and Development Biology. 25. 753-864.

Bashaw, EC, Funck, RC, Fehr, WR. 1987. Apomictic grasses. Principles of cultivar development. New York, Macmillan 2: 40-82.

Bradley, D.E., Bruneau, A.H. and Qu, R. 2001. Effects of cultivar, explant treatment, and medium supplemants on callus induction and plantlet regeneration in perennial Ryegrass. International Turfgrass Society Research Journal. 9: 152-156.

Cao, M.X, Huang, J.Q., He, Y.L., Liu, S.J., Wang, C.L., Jiang, W.Z. and We, Z.M. 2006. Transformation of recalcitrant turfgrass culrivars through improvement of tissue culture and selection regime. Plant Cell, Tissue and organ Culture. 85: 307-316.

Chaudhury A. and Qu R. 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration of turf-type bermudagrass: Effect of 6-benzyladenine in callus induction medium. Plant Cell, Tissue and organ Culture. 60: 113-120.

Goldman J.J., Hanna W.W. and Ozias-Akins P. 2004. Plant regeneration and an analysis of somaclonal variation from TifEagle and TifSport Bermuda grass cultivars. HortScience. 39: 1381-1384.

Griffin, J.D. & M.S. Dibble, 1995. High-frequency plant regeneration from seed-derived callus cultures ofKentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep 14: 721–724.

Jackson J.A and Dale PJ, 1989. Somaclonal variation in *Lolium multiflorum* L. and *L. Temulentum* L. Plant Cell Report. 8: 161-164.

Jian, M., Chengalrayan, K., Gallo M., and Mislevy, P. 2005. Embryogenesis callus induction and regeneration in a pentaploid hybrid bermudagrass CV. Tifton 85. Crop Sci. 45: 1069-1072.

Johnson, P.G. & T.P. Riordan, 1999. A review of issues pertaining to transgenic turfgrasses. HortSci 34: 594–598.

Ke, S. & C.W. Lee, 1996. Plant regeneration in Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via coleoptile tissue cultures. Plant Cell Rep 15: 882–887.

Kirsten AN, Eise L, Elisabeth K. 1993. Regeneration of protoplast derived green plants of Kentucky bluegrass (Poa pratensis L). Plant Cell Rep. 12: 537-540.

Lee, K. W., Chinzorig, O., Choi, G. J., Kim, K. Y., Ji, H. C., Park, H. S., ... & Lee, S. H. (2012). Factors influencing callus induction and plant regeneration of Dahurian wildrye grass (Elymus dahuricus L.). African Journal of Biotechnology, 11(4), 815-820.

Li, L. and Qu, R. 2002. *In Vitro* somatic embryogenesis in turf-type bermudagrass: rols of abscisic acid and gibberlic acid, and occurrence of secondary somatic embryogenesis. Plant Breeding. 12: 155-158.

Liu, P., Zhang, Z. X., Yuan, J. G., Xi, J. B., Du, X. L., & Yang, Z. Y. (2006). Callus induction and plant regeneration in eleven perennial ryegrass cultivars. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 20(3), 30-37.

Ma ZH, Zhang YF, Xu CX, Chen WJ, Yin HH, Kuai BK. 1999. Tissue culture and genetic transformation of Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) via micro-projectile bombardment. J. Fudan Univ. Nat. Sci. 38: 540-544.

Nielsen, K.A. & E. Knudsen, 1993. Regeneration of green plants from embryogenic suspension cultures of Kentucky blue grass (*Poa pratensis* L.). J Plant Physiol 141: 589–595.

Nielsen, K.A., E. Larsen & E. Knudsen, 1993. Regeneration of protoplast-derived green plants of Kentucky blue grass (*Poa pratensis* L.). Plant Cell Rep 12: 537– 540.

Qu, R. and Chaudury, A. 2001. Improved young inflorescence culture and regeneration of "TIFWAY" Bermudagrass (*Cynodon rtansvaalensis X C. dactylon*). International Turfgrass Society Research Joyrnal. 9: 198-201.

Salehi. H., Salegi M.R. and Ashiri F. 2008. Some condition for the best callus induction in common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers (California Origin)]. American-European Journal of Agriculture and Environment Sciences. 3: 409-413.

Taghizadeh M., 2012. Assessment of turfgrass potential for Lead phytoremediation, In Vitrocally Inducong and Molecular tracinf. University College of Agriculture and Natural Resoures. Faculty of science and engineering agriculture. Tehran University, Iran (in Persian).

Takahashi, W., Ebina, H.M., Takamizo, T. and Komatsu, T. 2002. Production of Trasngenic Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) via Microprojection Bombardment of Embryogenic Calli. Plant Biotechnology. 19: 241-249.

Van der Valk, P., Ruis, F., Tetterlaar, SAM., Van, VCM. 1995. Optimizing plant regeneration from seed-derived callus cultures of Kentucky bluegrass. The effect of benzyladenine. Plant Cell Tissue Organ, 40: 101-103.

Van der Valk, P, Zaal, MA, Creemers M. 1989. Somatic empryogenesis and plant regeneration in inflorescence and seed derived callus cultures of Poa pratensis L. (Kentucky bluegrass). Plant Cell Rep. 7: 644-647.

Wang, Y., Ruemmele, B.A., Chandlee J.M., Sullivan W.M., Knapp J.E. and Kausch A.P. 2002. Embryogenic Callus Induction and Plant Media for Bent grass and Annual Blue grass. In Vitro Cell Dev. Bio-Plant. 38: 460-467.

Wang, X., Hoshino, Y., & Yamada, T. (2010). Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (Zoysia japonica Steud.). Grassland science, 56(4), 198-204.

Yuan, X., Wang, Z., Liu J. and She J. 2008. Development of a plant regeneration from seed-derived calluses of centipedgrass [*Eremochloa ophiuroides* (Munto.) Hack]. Scietia Horticulture.

Callus Induction from Mature Seed in Kentucky Bluegrass (*Poa Pratensis* L.)

Fahimeh Sadat sajadi [1*], Mina Taghizadeh, Abdoollah Khadivi Khoob, Babak Valizadih Khji[2]

[1] MSc student, Arak University, faculty of agricultural and natural resources, department of science Horticulture, Markazi Province, Iran

[2] Assistance professor at science horticulture, faculty of agricultural and natural resources, Arak University, Markazi Province, Iran

[*]*Corresponding Author*: f-sajadi@msc.araku.ac.ir

Abstract

Kentucky bluegrass is one of the important cool-season grass species used in sports turf is mixed. This study was conducted to evaluate the callus induction from mature seed in Kentucky bluegrass. Induction callus on MS medium with two different of auxin, including 2, 4-D (0.5, 1 and 2 mg/l) and NAA (0.5, 1 and 2 mg/l) alone or in combination with two concentrations of 0 and 0.1 mg/l BA was evaluated. The results showed that among the different concentrations of 2, 4-D and BA there was no significant effect on induction callus and regeneration. While there was significant difference as much as one percent between different concentrations of the NAA and interaction of NAA and BA and the highest callus induction was obtained at a concentration of 0.5 mg/l NAA.