بررسی نقش مؤثر تنظیم‌کننده‌های رشد در ایجاد کالوس‌های جنین‌زا در ارقام مختلف گلایل

اشکانه کلانتری[۱]، پریسا کوباز *[۲]، مجید رستمی [۱] محمد فتحی قره بابا[۲]

[۱] گروه زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر، ملایر

[۲] گروه فیزیولوژی مولکولی، موسسه تحقیقات پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

*نویسنده مسئول: pkoobaz@abrii.ac.ir

چکیده

گلایل یکی از گل‌های پیازی زینتی با تنوع رنگ‌های مختلف است که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار می‌باشد. به دلیل تقاضای زیاد استفاده از این گل و زمان طولانی ایجاد پداژه‌های جدید دارای تولید تجاری، ریزازدیادی در محیط درون شیشه به عنوان یکی از روش‌های جایگزین برای تکثیر انبوه موردتوجه قرار گرفته است. به‌منظور تولید و بلوغ پداژه‌های کشت بافتی آزمایش‌هایی با غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ساکارز و همچنین برش‌های متفاوت از قسمت‌های مختلف پداژه انجام شد. در این تحقیق از ۵ رقم مختلف گلایل و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی پیکلورام (۰، ۱و۲ میلی‌گرم در لیتر برای جنین‌زایی) و ایندول‌بوتریک اسید (۰، ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر برای ریشه‌زایی) استفاده شد. نتایج نشان داد ریزنمونه بالایی استوانه مرکزی در رقم Ovatie بیشترین تولید جنین را داشته است همچنین، جوانه راسی رقم Chemistry در محیط کشت MS همراه با ۴میلی‌گرم ایندول بوتریک اسید بیشترین ریشه را تولید کرده است. غلظت ۶۰ گرم در لیتر ساکارز در بین ۳ غلظت مورد استفاده(۳۰ ، ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر) بیشترین میزان افزایش قطر پداژه را سبب شده است.

***کلمات کلیدی:* ایندول بوتریک اسید، پیکلورام، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، ریزازدیادی**

مقدمه

گلایل بزرگ‌ترین جنس (Gladiolus) از تیره زنبق‌ها (Iridaceae) است. این جنس دارای بیشتر از ۲۶۰ گونه است که برخی در درمان بیماری و اغلب به‌صورت زینتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. راحتی کار، مشکلات کمتر نسبت به سایر گیاهان شاخه بریده و پداژه‌ای بودن و تکثیر بسیار خوب، از دلایل محبوبیت گلایل در بازار ایران است که آن را جزء اولین گیاهان پداژه‌ای مورد استفاده زینتی قرار داده است. به دلیل تقاضای زیاد استفاده از این گل و زمان طولانی ایجاد پداژه‌های جدید دارای تولید تجاری' هرساله از کشورهای اروپایی (به‌خصوص هلند) پیاز گلایل به کشور وارد می‌شود. ریزازدیادی در محیط درون شیشه به عنوان یک روش جایگزین به‌جای روش‌های سنتی برای تکثیر رویشی گیاه ایجاد کرده است. این روش سطح تکثیر را چندین برابر افزایش می‌دهد و امکان تولید گیاهان عاری از ویروس و بیماری‌های دیگر را فراهم می‌کند. قطعات جداکشت مختلف از جمله نوک ساقه (Hussain et al., 2001)' جوانه‌های راسی (Priyakumari and Sheela, 2005)، قاعده برگ (Prasad and Gupta, 2006)' مریستم (Aftab et al., 2008) پداژه و پداژک' قطعاتی از گل‌آذین (Ziv and Lilien-Kipnis, 2000) برای باززایی در شرایط درون شیشه مورد آزمون قرار گرفته است.

هدف نهایی در ریزازدیادی گلایل ایجاد پداژه به‌طور مستقیم از قطعات مختلف جداکشت است. تولید این پداژه‌ها و ذخیره آن‌ها مانند بذر (استفاده در زمان مناسب) می‌تواند مشکلات جابجایی و سازگاری آن‌ها را کمتر کند.

بدین منظور اثر تنظیم‌کننده‌های رشد، غلظت ساکارز و موقعیت فلس بر پنج رقم گلایل تجاری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

در این تحقیق پنج رقم گلایل با نام‌های Chemistry، Invitalie، Maxial، White prosperty و Ovatie کشت شدند. آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با بررسی ۳ فاکتور رقم، محیط کشت و ریزنمونه با حداقل ۱۵ تکرار صورت گرفت. ابتدا پداژه‌ها کاملاً تمیز شدند، فلس رویی و همچنین ریشه‌های آن‌ها گرفته شد. سپس به مدت ۴۰ ثانیه با الکل ۷۰درصد، ۳۰ دقیقه با هیپوکلریت سدیم۵۰ درصد و ۳۰ دقیقه با نانوسیلور ۲/۵درصد ضدعفونی سطحی شده و بعدازاین مراحل سه نوبت آب شویی با آب مقطر استریل به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه انجام شد. در آزمایش اول با توجه به منابع موجود، برای جنین زایی محیط کشت MS همراه با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم پیکلورام + ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز+ ۷/۵ گرم در لیتر آگار و با PH ۷/۵ تهیه شد و قطعات جداکشت جوانه راسی، جوانه جانبی و بخش استوانه مرکزی (قاعده‌ای، میانی و بالایی) پداژه به عنوان ریزنمونه استفاده شد. در این آزمایش تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر قطعه جداکشت، مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایشی دیگر محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف ایندول بوتریک اسید (غلظت‌های ۲ و ۴ میلی‌گرم در لیتر) برای بررسی تأثیر ریشه‌زایی مورد آزمایش قرار گرفت (محیط کشت MS بدون تنظیم‌کننده رشد در هر دو آزمایش به عنوان شاهد استفاده شد). در آزمایش سوم گیاهچه‌های تولید شده در آزمایشات قبلی به محیط MS با غلظت‌های مختلف ۳۰، ۶۰ و ۹۰ گرم در لیتر ساکارز برای تولید پداژه منتقل شدند. درنهایت پداژک‌ها برای افزایش قطر در بهترین محیط قبلی(۶۰ میلی‌گرم در لیتر ساکارز) قرار گرفته و افزایش اندازه آن‌ها بررسی شد. تمامی مراحل آزمایش در شرایط استریل و زیر هود در آزمایشگاه کشت بافت انجام شده است و نمونه‌های کشت شده در اتاق رشد (فیتوترون) با دمای ۲۵درجه، ۱۶ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. و در فواصل زمانی مناسب اقدام به نمونه‌گیری و ثبت نتایج شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر رقم (پنج)، قطعه جداکشت (پنج) و محیط (سه) به‌تنهایی و اثر متقابل دوتایی و سه‌تایی بر تعداد کالوس‌های جنین‌زا در هر قطعه جداکشت تأثیر معنی‌داری داشت (جدول۱). با توجه به معنی‌دار بودن اثر متقابل رقم، محیط و قطعه جداکشت مشخص شد برش راسی استوانه مرکزی در محیط MS همراه با ۲میلی‌گرم پیکلورام در رقم Ovatie توانست بیشترین تعداد کالوس جنین‌زا (۴۴جنین)را ایجاد کند. نتیجه تحقیقات گذشته نشان داده که ۰/۱ میکرومول زآتین به همراه ۰/۲۵ میکرومول بنزیل‌آدنین باعث جنین‌زایی شده است (Rernotti., 1995).

جدول۱- تجزیه واریانس تأثیر رقم، محیط و قطعه جداکشت بر تولید کالوس جنین زا

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		جنین‌زایی ماه اول	جنین‌زایی ماه دوم
رقم	۴	۷۸۶/۵۸۷**	۱۹۱۳/۵۴۸**
محیط	۲	۶۷۳۱/۴۰۷**	۱۱۲۹۴/۶۹۷**
برش	۴	۱۸۰۹/۲۸۷**	۱۸۸۰/۹۹۱**
رقم* محیط	۸	۳۴۳/۲۸۱**	۷۰۶/۱۵۸**
رقم* برش	۱۶	۴۶۲/۲۹۳**	۴۷۵/۳۸۵**
محیط* برش	۸	۵۵۹/۹۰۶**	۶۱۱/۹۶۰**
رقم* محیط* برش	۳۲	۲۰۳/۶۸۷**	۲۴۷/۹۵۰**
خطا	۳۷۰	۲۲/۹۵۶	۲۵/۸۱۴

ns معنی‌دار نیست ، ** تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪، * تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪

در آزمایش دوم، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر رقم (پنج)، قطعه جداکشت (پنج) و محیط (سه) به‌تنهایی و اثر متقابل دوتایی و سه‌تایی تأثیر معنی‌داری بر ریشه‌زایی در هر قطعه جداکشت دارد(جدول۲). بررسی قطعات جداکشت در محیط MS با مقادیر مختلف ایندول بوتریک اسید برای ریشه‌زایی نشان داد قطعه جوانه راسی در محیط MS همراه با ۴میلی‌گرم ایندول بوتریک اسید در رقم Chemistry بیشترین تعداد ریشه (۲۰ریشه)را تولید کرده است. در ماه بعدی رشد ریشه و همچنین تولید برگ (به مقدار کم) از جوانه راسی و قسمت راسی استوانه مرکزی مشاهده شد (شکل۲). نتایج تحقیقات شاتر نشان که داد استفاده از ۰/۲ میلی‌گرم نفتالین استیک اسید و همچنین ۰/۲۵ و۰/۵ میلی‌گرم ایندول استیک اسید در محیط MS باعث ریشه‌زایی در ماه دوم شده است (Sutter., 1986).

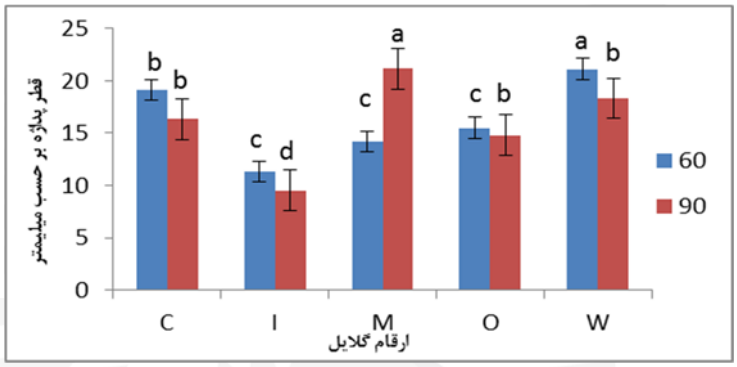
جدول۲- جدول تجزیه واریانس تأثیر رقم، محیط و قطعه جداکشت بر ریشه‌زایی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		ریشه‌زایی ماه اول	ریشه‌زایی ماه دوم
رقم	۴	*۲۱/۳۵۳	**۳۶/۲۱۶
محیط	۲	ns۲۱/۹۳۸	*۲۷/۵۰۱
برش	۴	**۷۶/۳۹۹	**۱۳۲/۴۴۵
رقم* محیط	۸	*۹/۶۵۸	*۱۲/۳۵۰
رقم* برش	۱۶	**۱۲/۴۴۷	**۱۴/۲۶۷
محیط* برش	۸	**۱۸/۵۱۵	**۳۳/۰۵۲
رقم* محیط* برش	۳۲	**۱۴/۷۹۶	**۱۹/۹۰۵
خطا	۴۴۹	۴/۶۲۷	۵/۸۷۳

ns معنی‌دار نیست ، ** تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪، * تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪

بررسی تأثیر غلظت ساکارز بر تعداد پداژک‌ها نشان داد بین ارقام مختلف در تولید پداژک تفاوت معنی‌داری وجود دارد .در همه ارقام به‌جز رقم Maxial محیط MS با ۶۰ گرم ساکارز بیشترین تعداد پداژه را نسبت به محیط MS با ۹۰ گرم ساکارز تولید نموده است(شکل۲). لازم به ذکر است قطعات جداکشت اولیه مورد استفاده برای رقم Maxil

جوانه‌های جانبی بودند که در محیط قبلی پیاز تولید کرده بودند و اختلاف حاصله به دلیل قطعه جداکشت اولیه است. درنهایت، در بین ارقام مورد استفاده رقم White prosperty بیشترین قطر پداژک (۲/۱ سانتی‌متر) را در محیط MS با ۶۰ گرم ساکارز ایجاد نموده است (شکل ۱) . بررسی‌های انجام شده بر پداژک‌های هیبرید پرنسس لی نشان داد استفاده از محیط MS ½ همراه ۶۰گرم بر لیتر ساکارز بزرگ‌ترین پداژک (با قطر ۱/۵ سانتیمتر) را تولید نموده است (Dharmasena et al., 2011).



شکل ۱- تأثیر غلظت ساکارز بر قطر پداژه ارقام مختلف پس از یک ماه (C= Chemistry - I= Invitalie - M= Maxial- O= Ovatie- W= White prosperty)

شکل ۲- تولید ریشه و برگ در رقم Chemistry(A) و تولید پداژه و افزایش قطر در محیط MS با ۶۰ گرم ساکارز(B)

منابع

Aftab, F. M. Alam and H. Afrasiab. 2008. In vitro shoot multiplication and callus induction in Gladiolus hybridus Hort. Pakistan Journal Botany. 40(2):517-522.

Dharmasena, P.A.I.U., Karunananda1, D.P., and Eeswara, J.P. (2011). Effect of Gibberellic Acid (GA3) and Sugar on In Vitro Cormlet Formation, Multiplication and Ex Vitro Sprouting of Gladiolus hybrida Variety Princess Lee. Tropical Agricultural Research. 23(1): 1–10.

Hussain, I., A. Muhammad, H. Rashid, and A. Quraishi. 2001. In vitro multiplication of gladiolus (Gladiolus crassifolius). Plant Tissue Culture. 11:121-126.

Prasad, V.S.S. and Gupta, S.D. 2006. In vitro shoot regeneration of gladiolus in semisolid agar versus liquid cultures with support systems. Plant Cell, Tissu Organ Culture. 87:263-271.

Priyakumari, I. and V.L. Sheela. 2005. Micropropagation of gladiolus cv. 'Peach Blossom' through enhanced release of axillary buds. Journal Tropical Agriculture. 43(1-2):47- 50.

Rernotti P.C., (1995). Primary and secondary embryogenesis from cell suspension cultures of Gladiolus. Plant Science, 107: 205-214. 2)

Sutter E.G., (1986). Micropropagation of Ixia viridifolia and a Gladiolus × Homoglossum hybrid. Scientia Horticulturae, 29 (1-2): 181-189.

Ziv, M. and Lilien-Kipnis, H. 2000. Bud Re-generation from Inflorescence Explants for Rapid Propagation of Geophytes in Vitro. Plant Cell Report, 19, 845-850

Effect of Different Hormones to Produce Embryogenic Calli in Different Gladiolus Cultivar

Ashkaneh Kalantari[1], Parisa Koobaz [*2] Majid Rostami[1] and Mohammad FathiGharebaba[2]
[1] Department of Agriculture, MalayerUniversity, Malayer, Iran
[2] Departmentof Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, AREEO, Karaj, Iran
[*]*Corresponding Author: pkoobaz@abrii.ac.ir*

Abstract

Gladiolus is one of the ornamental bulbous flowers with a variety of different colors and high economic value. *In vitro micropropagation* is considered as one of the alternative methods for mass propagation and create a new corm with commercial production due to high demand and time consuming to produce this flower traditionally. This experiment were done using different concentrations of plant growth regulators, Sucrose concentration and different explants of corm is done to produce and mature tissue culture. Number of embryogenic calli, roots per explant and diameter of cormlet were evaluated. In this study, five varieties of Gladiolus, ,two Picloram concentration (0, 1 and 2 mg per liter for embryogenesis) and 2 concentrations of indole butyric acid (0, 2 and 4 mg per liter for rooting) were used. The results showed upper part of central cylinder in the Ovatie produced the highest embryogenic callus. The highest number of roots was achieved by apical buds of Chemistry in MS media supplemented by 4 mg indole butyric acid. The last experiment showed that using 60 grams per liter sucrose may evolve the highest corm diameter.
***Key words*: Indolyl butyric acid, micropropagation, Picloram, plant growth regulators**