اثر تنظیم کننده های رشد برکالوس زایی و باززایی گیاه اطلسی از مریستم انتهایی

مریم جمشیدنیا [1*]، سیروس قبادی [2]، بدرالدین ابراهیم سیدطباطبایی [2]، احد یامچی [3]

1- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات (ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. 2- استادیار و استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. 3- استادیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

* نویسنده مسئول (box_bio@yahoo.com, m.jamshidnia@ag.iut.ac.ir)

چکیده

باززایی رقم‌های خارجی و ایرانی اطلسی از ریزنمونه مریستم انتهایی به هدف تراریختی با اگروباکتریوم انجام گرفت. در این بررسی مریستم انتهایی از گیاهچه‌های 7 روزه جدا گردید و به منظور شاخه‌زایی در محیط کشت MS دارای ویتامین‌های B5 شامل 12 تیمار با غلظت‌های مختلفی از نفتالین استیک اسید (صفر، 0/2، 0/5 میلی گرم در لیتر) و بنزیل آمینو پورین (صفر، 0/1، 0/5، 1 میلی گرم در لیتر) منتقل گردید. بیشترین درصد کالوس زایی P. hybrida cv. Supercascaide در محیط کشت حاوی 0/5 میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و 0/5 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین حاصل شد. هنگامی که سایتوکینین بدون حضور اکسین در محیط کشت استفاده شد، کالوس زایی به طور مؤثری کاهش یافت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SAS نشان داد که بیشترین تشکیل ریشه در محیط کشت حاوی 0/5 میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و 0/1 میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین ایجاد شد.

کلمات کلیدی: اطلسی، باززایی، مریستم انتهایی.

مقدمه

گیاه زینتی اطلسی در صنعت گیاهان حاشیه ای از اهمیت زیادی برخوردار است. بهینه سازی باززایی گیاه اطلسی قبل از انتقال ژن یا ژن‌های مطلوب یک شرط اساسی می باشد. تا کنون از روش‌های مختلف کشت بافت در گیاه اطلسی استفاده شده است (1). ریزنمونه مریستم انتهایی برای باززایی و انتقال ژن به بسیاری از گیاهان ترجیح داده می شود زیرا اغلب گیاهان دولپه ای و تک لپه ای با کشت بافت از طریق این ریزنمونه قابلیت باززایی دارند (2). همچنین تنوع سوماکلونال و موتاسیون در گیاهان باززا شده از مریستم انتهایی بسیار کم است. باززایی از مریستم انتهایی در صنعت گیاهان زینتی از اهمیت زیادی برخوردار است (3). باززایی درون شیشه ای از مریستم انتهایی یکی از بهترین روش‌های حذف ویروس می باشد که در مدت زمان کمی تعداد زیادی گیاه تولید می کند. همچنین این روش ابزار قدرتمندی برای ریزازدیادی محصولات کشاورزی در مقیاس وسیع می باشد(3). بر این اساس در این پژوهش بهینه سازی باززایی گیاه اطلسی از طریق مریستم انتهایی در رقم‌های ایرانی و خارجی با هدف مقدمه ای برای انتقال ژن صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

بذرهای اطلسی هیبرید (P. hybrida cv. Supercascaide) به مدت 10 دقیقه در محلول 1/5 درصد هیپوکلریت سدیم گندزدایی سطحی و سپس 3 بار با آب مقطر استریل شتشو داده شدند. پس از ضدعفونی تعداد 30 بذر در ظروف پتری حاوی 20 میلی لیتر محیط پایه MS برای مدت 7 روز و در روشنایی 40 میکرومول بر مترمربع در ثانیه و دمای 2±25 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. به منظور جداسازی مریستم در ابتدا به وسیله سوزن سرنگ دو برگ لپه ای حذف و بعد از آن مریستم به همراه دو سرآغازه جدا شد زیرا سرآغازه، تنظیم کننده های رشد و دیگر عوامل مؤثر در رشد و توسعه مریستم را فراهم می کند (4).

به منظور تعیین بهترین محیط شاخه زایی 180 مریستم به همراه سرآغازه در یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با 12 تیمار شاخه زایی به محیط پایه MS حاوی ویتامین های B5 که دارای غلظت های مختلفی از 1NAA (صفر، 0/2، 0/5 میلی گرم در لیتر) و 2BAP (صفر، 0/1، 0/5، 1 میلی گرم در لیتر) بودند، منتقل گردیدند. به منظور ریشه زایی، ساقه‌ها از قطعات برگ جدا شده و در محیط ریشه زا (نمک‌های MS حاوی ویتامین‌های B5 که دارای 0/1 میلی گرم در لیتر NAA بود)، قرار داده شدند.

کلیه داده توسط نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید. همچنین میانگین ها با استفاده از آزمون LSD در سطح 5 درصد با یکدیگر مقایسه شدند. درصد کالوس زایی، درصد ریزنمونه شاخه دار و درصد تشکیل ریشه اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر BAP و NAA به تنهایی و برهمکنش آن‌ها در تولید کالوس وریشه در سطح یک درصد معنی دار بود.

اثر BAP و NAA بر کالوس زایی و قابلیت باززایی ریشه گیاه اطلسی از ریزنمونه مریستم انتهایی در جدول 1 نشان داده شده است. بیشترین درصد کالوس زایی در محیط کشت حاوی 0/5 و 1 میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد. هنگامی که 0/5 میلی گرم در لیتر BAP به همراه 0/5 میلی گرم در لیتر NAA بکار رفت، 90 درصد کالوس زایی مشاهده شد (جدول 1). کالوس زایی با استفاده BAP به تنهایی بسیار کاهش یافت. NAA به تنهایی منجر به تولید کالوس شد و BAP در این امر اثری نداشت. این نتایج با یافته-های ادریس و همکاران (5) مطابقت داشت که اظهار داشتند غلظت‌های بالای اکسین (NAA) فقط منجر به تولید کالوس می گردد و BA و کینتین3 بر کالوس زایی در کشت مریستم سیب زمینی نقشی نداشتند. به بیان دیگر، افزودن BAP به محیط کشت پایه با غلظت‌های صفر تا 1 میلی گرم در لیتر به طور مؤثری فراوانی کالوس زایی را افزایش داد. با استفاده سایتوکینین به تنهایی در غلظت‌های آزمایش شده شاخه‌ها بدون تشکیل کالوس تولید شدند (6). همچنین در غلظت‌های ملایم اکسین و سایتوکینین میزان زیادی کالوس تشکیل شد. تیمار 0/5 میلی گرم در لیتر NAA و 0/5 میلی گرم در لیتر BAP مشخص شد که برای کالوس زایی در اطلسی بسیار مؤثر می باشد. کالوس در محیط کشت حاوی 0/5 میلی گرم در لیتر BAP به همراه 0/5 میلی گرم در لیتر NAA زرد رنگ بود (شکل A1). کالوس سفید رنگ در محیط کشت حاوی حاوی 0/1 میلی گرم در لیتر BAP به همراه 0/5 میلی گرم در لیتر NAA یا 0/1 میلی گرم در لیتر BAP به همراه 0/2 میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد (شکل B1). افزودن BAP تا 1 میلی گرم در لیتربه محیط کشت‌های حاوی غلظت‌های مختلفی از NAA سبب تولید کالوس‌های سبز رنگ گردید (شکل C1). جدول 1 نشان داد که سایتوکینین به تنهایی در محیط کشت هیچ اثری در کالوس زایی نداشت اما افزودن BAP فراوانی کالوس زایی را در تیمارهای محتوی NAA را افزایش داد. این بدان معنی است که NAA برای القای کالوس کافی است درحالی که BAP رشد بافت کالوس را تحریک می کند.

[1] . Naphthalenacetic acid
[2] . ٦-Benzylaminopurine
[3] .Kinetin

جدول 1- برهمکنش BAP و NAA بر درصد کالوس زایی، شکل و رنگ کالوس و درصد ریشه دهی.

تعداد	تنظیم کنندگان رشد (mg l-1)		درصد کالوس زایی	شکل و رنگ کالوس	درصد ریشه دهی
	NAA	BAP			
1	0	0	g†0	-	d0
2	0	0/1	g0	-	d0
3	0	0/5	g0	-	d0
4	0	1	g0	-	d0
5	0/2	0	f10	Friable PY††,	d0
6	0/2	0/1	e20	WY, Friable	b30
7	0/2	0/5	d40	PG, Compact	d0
8	0/2	1	c60	PG, Compact	d0
9	0/5	0	f15	PY, Friable	c20
10	0/5	0/1	e25	WY, Friable	a40
11	0/5	0/5	a90	PY, Friable	d0
12	0/5	1	b70	PG, Compact	d0

† در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آزمون LSD در سطح احتمال 5% معنی دار نیستند.

†† pale green color=PG ، pale yellow color =PY، white yellow color.=WY

شکل 1- A) کالوس زرد در محیط کشت حاوی 0/5 میلی گرم در لیتر NAA یا 0/5 میلی گرم در لیترBAP. B) کالوس سفید در محیط کشت محتوی 0/2 میلی گرم در لیتر NAA یا 0/1 میلی گرم در لیترBAP . C) کالوس سبز ر محیط کشت دارای 0/5 میلی گرم در لیتر NAA به همراه 1 میلی گرم در لیترBAP .

نتایج درصد تشکیل ریشه از ریزنمونه مریستم انتهایی در جدول 1 نشان داده شده است. القای ریشه از ریزنمونه مریستم انتهایی در محیط کشت حاوی 0/2 میلی گرم در لیتر NAA یا 0/1 میلی گرم در لیتر BAP و محیط کشت محتوی 0/5 میلی گرم در لیتر NAA مشاهده شد. بیشترین درصد ریشه (40%) با استفاده 0/5 میلی گرم در لیتر NAA و 0/1 میلی گرم در لیتر BAP حاصل شد

(جدول 1). یافته‌ها با گزارشات پژوهشگران پیشین (7) مطابقت داشت. برخی گیاهان مشخص شده است که میزان زیادی اکسین تولید می کنند (8)، این یافته می تواند دلیل توانایی ریشه زایی کشت‌های اطلسی در این مطالعه باشد. تولید ریشه از کالوس سبب مشکلاتی در تولید شاخه‌های جانبی می گردد. در نتجه هنگامی که باززایی از کالوس مدنظر قرار دارد، باید محیط کشتی بکار رود که حداقل تعداد ریشه از کالوس را ایجاد نماید.

منابع

Dole, JM., HF. Wilkins, 2005. Floriculture principles and species. pp.744-750.

Ulian, EC., RH. Smith, J. Gould, and T. McKnight. 1988. Transformation of plants via the shoot apex.). In vitro Cell Developmental Biology. 24: 951-954.

Rout, GR., A. Mohapatra, and SM. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnology Advances. 24: 531-560.

Baogong, J. 2004. Optimization of Agrobacterium- mediated cotton transformation using shoot apices explants and quantitative trait loci analysis of yield and yield component traits in upland cotton (Gossypium hirsutum L.). Ph.D. Dissertation, Louisiana State University, U.S.A, 106p.

Edriss, M.H., M.A. Badawy, S. Fathi, and T.M. El. Barkouki. 1996. Propagation of potato using tissue culture technique. Acta Horticulture. 434, 413-418.

Hatzilazarou, S., A. Economou, T. Antoniou, and P. Ralli. 2001. Propagation of Ebenus cretica L. by tissue culture. Propagation of Ornamental Plants. 1: 25-27.

De Oliveiva, SA., MFPS. Machado, AJ. Prioli, and CA. Mangolin. 1995. In vitro propagation of Cereus peruvianus Mili (Cactaceae). In vitro Cell Developmental Biology. 94-98.

Hubstenberger, JF., PW.Clayton, and GC. Philips. 1992. Micropropagation of cacti (Cactaceae). In: Baja YPS (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-tech and Micropropagation FJ, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 49-68.

The Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Regeneration of Petunia via Shoot Apex

Maryam Jamshidnia1*, Cyrus Ghobadi2, Badraldin Ebrahim Sayed Tabatabaei2, Ahad Yamchi3

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. *Corresponding author: (box_bio@yahoo.com, m.jamshidnia@ag.iut.ac.ir). 2- Department of Agricultural Biotechnology, Isfahan University of Technology, Isfahan 84156-83111, Iran. 3- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

Regeneration of Iranian and foreign species of petunia plant via shoot apex was optimized to continue Agrobacterium-mediated transformation studies. In this experiment, shoot apex from 7-day old petunia seedlings and MS + B5 vitamin media supplemented with various concentrations of NAA (0,0, 0,2, 0,5 mg l-1) and BAP

(0,0, 0,1, 0,5, 1 mg l-1) were used in a CRD with 12 shoot proliferation treatments. Callus induction percentage and rooting percentage was analyzed. The highest callus induction percentage in P. hybrida cv. Supercascaid was obtained in the medium containing 0,5 mg l-1 BAP and 0,5 mg l-1 NAA. Callus induction was reduced significantly when cytokinin was used without NAA. The statistical analysis indicated that the highest root formation was obtained in MS medium supplemented with 0,1 mg l-1 BAP and 0,5 mg l-1 NAA.

Keywords: Petunia, Regeneration, Shoot apex.