بررسی اثر سطوح هورمونی بر رویان‌زایی توده‌های بومی تره ایرانی (*Allium ampeloprasum spp. Persicum*) به روش ماده زایی در محیط درون شیشه ای

زهرا قهرمانی [1*]، محمدرضا حسندخت [2]، عبدالکریم کاشی [3]، منصور امیدی [4]، مریم جعفرخانی کرمانی [5]
1- استادیار دانشگاه زنجان. 2،3،4- دانشیار و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. 5- استادیار موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کرج.
تلفن: 0241-5152399 E-mail: ghahremani.z@znu.ac.ir

چکیده

این پژوهش به منظور ارزیابی واکنش هفت توده منتخب تره ایرانی از نظر صفات زراعی به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در طرح پایه کاملا تصادفی که شامل سه سطح هورمونی B2D0 (2 میلی‌گرم در لیتر BA) ، B2D2 (2 میلی‌گرم در لیتر BA و 2 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و B2D4 (2 میلی‌گرم در لیتر BA و 4 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و هفت توده تره ایرانی (گرگان، نیشابور، همدان، میانه، کنگاور، ورامین و کرمان) در سه تکرار انجام شد . صفات درصد رویان‌زایی، درصد باززایی گیاه، درصد بقای گیاه، درصد کالوس زایی، درصد شیشه‌ای شدن گل‌ها و زمان لازم جهت ظهور رویان ارزیابی شدند. در این آزمایش از مجموع 18900 گل کشت شده در محیط کشت‌های مختلف، 459 رویان (2/43 درصد) تولید شد، که همه آن‌ها به گیاه کامل تبدیل شدند. بیشترین درصد رویان‌زایی و باززایی گیاه (25 درصد) در توده گرگان و میانه در محیط کشت B2D2 مشاهده شد. نتایج نشان داد کشت گل گرده افشانی نشده روش موثری برای ماده‌زایی تره ایرانی در محیط درون شیشه‌ای است.

واژه های کلیدی: تره ایرانی، ماده‌زایی، کشت درون شیشه‌ای و کشت گل کامل.

مقدمه

تره ایرانی (*Allium ampeloprasum* spp. Persicum) گیاهی از تیره Alliaceae است که اندمیک ایران می‌باشد و در هیچ کشوری غیر از ایران یافت نمی‌شود. سالیانه حدود 5000 تن تره ایرانی برداشت می‌شود (Musavi et al., 2006). از آنجائی که تره ایرانی بومی ایران بوده و سال‌های زیادی مورد کشت و کار قرار گرفته است، توده‌های زیادی از آن با ویژگی‌های متفاوت در مناطق مختلف سازگار شده‌اند. با وجود پراکنش وسیع تره ایرانی برنامه به نژادی در خور توجهی روی آن صورت نگرفته است. تره ایرانی به علت ناهمرسی از نوع پروتاندری، گیاهی دگرگشن می‌باشد. توده-های موجود در ایران هتروزیگوت بوده و به منظور تولید بذر هیبرید F_1 لازم است از آن‌ها لاین خالص تهیه شود. اولین قدم در تولید لاین خالص تولید گیاهان هاپلوئید می‌باشد. به روش‌های مختلفی می‌توان گیاه هاپلوئید تهیه کرد که ماده-زایی و نرزایی در محیط درون شیشه‌ای از جمله این روش‌ها می باشند. در طی دهه اخیر استفاده از ماده‌زایی برای تولید گیاهان هاپلوئید و لاین‌های خالص در پیاز خوراکی و سایر سبزی های پیازی معمول شده است (Alan et al., 2004; Bohance, 2002; Hassandokht et al., 2000). ترکیب‌های مختلف محیط کشت بر روی رویان‌زایی تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی مطالعه گردیده است و نمک‌های محیط کشت پایه BDS (Dunstan & Short, 1977) و B_5 (Gamborg et al., 1968) مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Bohance, 2002). تاثیر مثبت BA و 2,4-D بر رویان‌زایی پیاز خوراکی توسط برخی محققین (Hassandokht & Campion, 2002; و Martinez et al., 2000) گزارش شده است. آزمایش‌های انجام شده نشان داده است که ژنوتیپ یکی از مهم‌ترین عوامل موثر در واکنش به روش ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای است (Bohance, 200; Hassandokht & Campion, 2002) این آزمایش با هدف ارزیابی

واکنش توده‌های تره ایرانی منتخب به ماده‌زایی در محیط درون شیشه‌ای انجام گرفت، تا پروتکل تولید رویان جهت تحقیقات بعدی تولید گیاه هاپلوئید و لاین خالص مشخص شود.

مواد و روش ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملا تصادفی شامل هفت توده و سه محیط کشت، B2D0 ، B2D2 و B2D4 در سه تکرار انجام شد. برای کشت گل‌ها در محیط درون شیشه‌ای، چتر گل سه تا پنج روز قبل از باز شدن از بوته جدا شده و به منظور ضدعفونی سطحی، ابتدا به مدت 30 ثانیه در الکل صنعتی 96% و سپس به مدت 10 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم 1% قرار گرفتند و پس از آن سه بار با آب مقطر دو بار تقطیر شده سترون شستشو شدند. سپس گل‌ها با دم گل کوتاه (2 میلی‌متر) روی محیط کشت القایی 1 (حاوی سطوح مختلف هورمونی) کاشته شدند (جدول 1).

در هر پتری دیش 15 ×90 میلی‌متر، 30 غنچه گل کاشته شد. درب پتری‌ها به وسیله پارافیلم پوشانده شدند و در اطاقک رشد با دمای 22 درجه سانتی‌گراد و تحت نور مصنوعی لامپ‌های فلورسنت به مدت 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی قرار داده شدند. گل‌های متورم شده پس از گذشت یک ماه به محیط کشت القائی 2 که حاوی عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS، عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5 و بدون هورمون و میزان ساکارز 100 گرم در لیتر بود، انتقال داده شدند (Campion et al., 1995). رویان‌ها پس از ظهور، در شرایط سترون از گل جدا شده و به محیط کشت باززایی که حاوی عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS، عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5 و بدون تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و میزان ساکارز آن 40 گرم در لیتر بود، انتقال (Campion et al., 1995 b) و در دمای 22 درجه سانتی‌گراد و با همان دوره نوری قبلی قرار داده شدند. لازم به ذکر است pH در تمام محیط‌های کشت 5/8-6 تنظیم گردید (Campion et al., 1992). صفات درصد رویان‌زایی (تعداد رویان مشاهده شده در 100 گل کشت شده)، درصد باززایی گیاه (تعداد گیاه باززایی شده در 100 گل کشت شده)، درصد بقا گیاه (تعداد گیاه باززایی شده در 100 رویان)، زمان لازم جهت ظهور رویان (روز)، درصد شیشه‌ای شدن گل‌ها و درصد تولید کالوس یادداشت برداری شدند. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار SAS انجام گرفت. میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

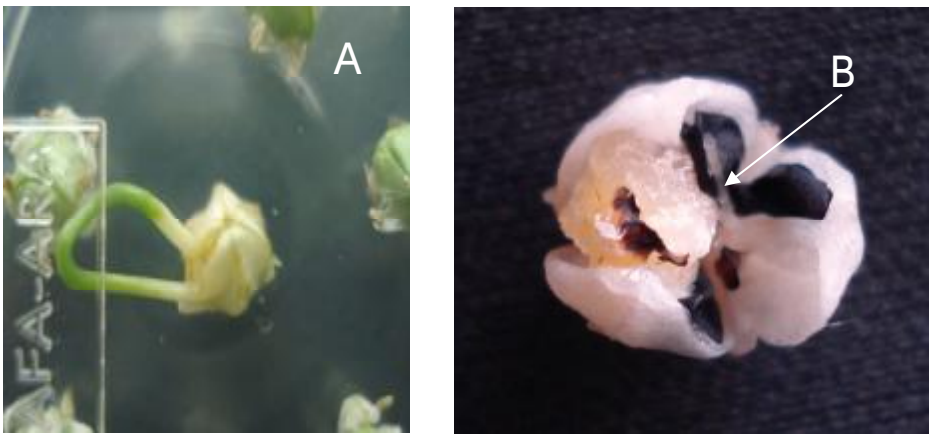
جدول 1- ترکیب محیط های کشت B2D4، B2D2 و B2D0 (محیط کشت القایی 1)

ترکیبات	محیط کشت		
	B2D4	B2D2	B2D0
عناصر پر مصرف محیط کشت پایه BDS	+	+	+
عناصر کم مصرف محیط کشت پایه B5	+	+	+
ساکارز (گرم در لیتر)	100	100	100
2,4-D (میلی گرم در لیتر)	4	2	-
BA (میلی گرم در لیتر)	2	2	2
آنتی بیوتیک استرپتومایسین (میلی گرم در لیتر)	30	30	30

ویتامین‌ها شامل: تیامین 2 میلی گرم در لیتر، پیریدوکسین 1 میلی گرم در لیتر، نیکوتینیک اسید 1 میلی گرم در لیتر، میواینوزیتول 200 میلی گرم در لیتر، آگار 6 گرم در لیتر

نتایج و بحث

گل های کشت شده در محیط کشت بعد از یک تا دو روز باز و کلاله آن‌ها طویل شدند. تخمدان‌ها رشد متفاوتی داشتند و از روز چهارم به بعد شروع به متورم شدن کردند و تا 30 روز بعد از کاشت این عمل ادامه یافت. رویان ها 26 تا 155 روز پس از واکشت گل‌ها در محیط کشت القایی 2 ظاهر شدند (شکل 1.A). منشا مادەزایی رویان‌ها زمانی تایید شد که آن‌ها هنوز تا حدودی با باقیمانده تخمک پوش[1] سیاه رنگ پیچیده شده بودند (شکل 1.B). طبق گزارش Campion et al., 1992 منشا رویان‌های دارای تخمک پوش مستقیما کیسه جنینی می باشد.



شکل 1- تولید رویان به روش ماده زایی در تره ایرانی. (A) ظهور رویان مادەزا (B) ظهور رویان احاطه شده به وسیله پوشش سیاه رنگ

کالوس‌زایی 100 روز بعد از کشت گل‌ها در محیط کشت القایی 2 در توده‌های کرمان، همدان، ورامین، نیشابور و کنگاور مشاهده شد. شیشه‌ای شدن گل‌ها در هیچ کدام از واحدهای آزمایشی مشاهده نشد.

[1]. Integument

بر اساس نتایج اثر متقابل توده و محیط کشت (جدول 2) بیشترین میزان رویان‌زایی (25 و 24 درصد) و باززایی (25 و 24 درصد) مربوط به توده‌های گرگان و میانه در محیط کشت B2D2 (2 میلی‌گرم در لیتر BA و 2 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) بود. توده‌های کرمان و ورامین با میانگین 2 درصد رویان و گیاه باززایی شده در محیط کشت B2D4 (2 میلی-گرم در لیتر BA و 4 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) و توده‌های همدان، ورامین و نیشابور به ترتیب با میانگین 2/2 و 1/66 درصد رویان و گیاه باززایی شده در محیط کشت B2D0 (2 میلی‌گرم در لیتر BA) کمترین درصد رویان‌زایی و باززایی را به خود اختصاص دادند. وجود غلظت بالای 2,4-D (4 میلی گرم در لیتر) در محیط کشت B2D4 و عدم وجود 2,4-D در محیط کشت B2D0 منجر به کاهش درصد رویان‌زایی و باززایی شده است. 2,4-D برای بعضی از لاین های با پاسخ پایین مضر است و باعث کاهش میزان القای رویان‌زایی در آن‌ها می گردد (Bohanec., 2002).

جدول2- مقایسه میانگین اثر متقابل محیط‌های کشت (M_1: B2D2, M_2: B2D4, M_3: B2D0) و توده‌ها (G_1 گرگان، G_2 کرمان، G_3 همدان، G_4 ورامین، G_5 میانه، G_6 نیشابور، G_7 کنگاور) از نظر رویان‌زایی، باززایی، بقای گیاه و کالوس‌زایی

صفات / توده× محیط کشت	درصد رویان زایی	درصد باززایی	درصد بقا	درصد کالوس زایی
M_1G_1	25 a	25 a	100 a	0c
M_1G_2	6/66 ed	6/66 ed	100 a	4/33 b
M_1G_3	8/33 cd	8/33 cd	100 a	1 c
M_1G_4	5/33 def	5/33 def	100 a	1 c
M_1G_5	24a	24a	100 a	0 c
M_1G_6	2fg	2fg	100 a	0 c
M_1G_7	4/33 efg	4/33 efg	100 a	6/66 a
M_2G_1	8/33 cd	8/33 cd	100 a	0 c
M_2G_2	2 fg	2 fg	100 a	1 c
M_2G_3	6/33 de	6/33 de	100 a	1/33 c
M_2G_4	2 fg	2 fg	100 a	0 c
M_2G_5	15 b	15 b	100 a	0 c
M_2G_6	5/66 ed	5/66 ed	100 a	0 c
M_2G_7	6 ed	6 ed	100 a	0 c
M_3G_1	11/33 c	11/33 c	100 a	0 c
M_3G_2	4 efg	4 efg	100 a	0 c
M_3G_3	2 fg	2 fg	100 a	0/33 c
M_3G_4	2 fg	2 fg	100 a	0 c
M_3G_5	5/33 def	5/33 def	100 a	0 c
M_3G_6	1/66 g	1/66 g	100 a	0/33 c
M_3G_7	6ed	6ed	100 a	0/66 c

ستون های دارای حروف مشابه در سطح 1 درصد با هم تفاوت معنی داری ندارند.

تمام توده‌ها در کلیه محیط‌های کشت از 100 درصد بقای گیاه بر خوردار بودند. توده کنگاور در محیط کشت B2D4 (2 میلی‌گرم در لیتر BA و 4 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D) دارای بیشترین میزان کالوس‌زایی بود. اثر مثبت 2,4-D بر کالوس‌زایی قبلا توسط محققین زیادی گزارش شده است (Alan et al., 2004; Hassandokht et al., 2000; Bohance, 2002). در محیط کشت B2D0 (2 میلی‌گرم در لیتر BA) کالوس‌زایی در کلیه توده‌ها نزدیک به صفر درصد بود.

در این آزمایش از مجموع 18900 گل کشت شده در محیط کشت‌های مختلف 459 رویان (2/43 درصد) تولید شد. از این تعداد 20 رویان (4/35 درصد) فقط ریشه تولید کردند و 439 رویان (95/64) به گیاه کامل تبدیل شدند (شکل 2.C).

شکل 2- (C) گیاه کامل حاصل از ماده‌زایی

بررسی اثر سه سطح هورمونی، BA و 2,4-D نشان داد که سطوح مختلف هورمونی در توده‌های تره ایرانی ، بسته به نوع توده می‌تواند باعث القای رویان‌زایی متفاوت در کشت درون شیشه‌ای شود. با توجه به این که توده‌های مورد استفاده در این پژوهش دارای گرده افشانی آزاد بودند، لذا واکنش کم آن‌ها به پدیده ماده زایی طبیعی بود. Bohanec (2002) علت نوسان داشتن پتانسیل ماده‌زایی در ژنوتیپ‌ها را وجود برخی ژن‌ها در گیاهان باززایی شده ماده‌زا می داند. تلاقی لاین های با موفقیت و بدون موفقیت باعث افزایش توان ماده زایی نتاج هیبرید می گردد، زیرا با تلاقی ژنوتیپ های با پاسخ دهی بالا با لاین های بدون پاسخ و با پاسخ کم می‌توان ماده‌زایی را در نتاج آن‌ها ایجاد و یا افزایش داد (Bohanec et al., 1999). لذا باید پژوهش‌های بعدی بر روی توده‌های تره ایرانی که پاسخ کمی به القای رویان‌زایی نشان دادند، مورد توجه قرار گیرد. این آزمایش اولین گزارش در مورد رویان‌زایی گیاه تره ایرانی در محیط درون شیشه‌ای می‌باشد و باید توده‌ها و محیط‌های کشت بیشتری مورد آزمایش قرار گیرند، زیرا از معایب روش ماده‌زایی درصد موفقیت کم در تولید رویان است و باید توده‌های زیادی مورد آزمایش قرار گیرند تا بهترین آن‌ها با پتانسیل تولید رویان بالا برای تولید گیاهان دابل هاپلوئید به منظور تولید لاین خالص انتخاب شود.

References

1. Alan, A.R., Brants, A., Cobb, E., Goldschmied, P.A., Mutschler, M.A. & Earle E.D. (2004). Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) *breeding materials. Plant Science*, 167, 1055-1066.
2. Bohanec, B. (2002). Double-haploid onions. In: Rabinowich, H.D., Currah, L. (ed.): *Allium Crop Science* - Recent Advances. CABI, London. 145-157.

3. Bohanec, B. & Jakše, M. (1999). Variation in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Report*, 18, 737-742.
4. Campion, B., Azzimonti, M.T., Vicini, E., Schiavi, M. & Falavigna, A. (1992). Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Science*, 86, 97 – 104.
5. Campion, B., Perri, E. & Azzimonti, M.T. (1995b). Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Breeding*, 114, 243-246.
6. Dunstan, D.I. & Short, K.C. (1977). Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiologia Plantarum*, 41, 70-72.
7. Gamburg, O.L., Miller, R.A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Response*, 50, 151-158.
8. Hassandokht, M.R & Campion, B. (2002). Low temperature, medium and genotype effect on the gynogenic ability of onion (*Allium cepa* L.) flowers cultured *in vitro*. Advance Horticulture *Science*, 16, 72-78.
9. Martínez, L., Agüero, C., Lopez, M.E. & Galmarini, C.R. (2000). Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Science*, 156, 221-226.
10. Mousavi, A., Kashi, A., Davoodi, D. & Sanei Shariatpanahi, M. (2006). Characterization of an allium cultivated in Iran: the Persian leek. *Belgian Journal of Botany*, 139 (1), 115-123.

The study of hormone surfaces on embryogenesis of Persian leek populations (*Allium ampeloprasum* spp. Persicum) via *in vitro* gynogenesis

Z. GHAHREMANI[*1], M.R. HASSANDOKHT[2], A. KASHI[3], M. OMIDI[4], M. JAFARKHANI KERMANI[5]

1, Assistant Professor University of Zanjan , 2, 3, 4, Associate and Professors, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

5, Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj

Abstract

This research was carried out to evaluate the response of seven of selected Persian leek accessions to *in vitro* gynogenesis. The experimental design was factorial based on completely randomized design with three culture medium B2D0 (2 mgl^{-1} BA), B2D2 (2 mgl^{-1} BA and 2 mgl^{-1} 2, 4-D) and B2D4 (2 mgl^{-1} BA and 4 mgl^{-1} 2, 4-D) and seven Persian leek accessions (Gorgan, Neishabur, Hamedan, Mianeh, Kangavar, Varamin and Kerman) with three replications. Traits of embryo rate, regeneration rate, survival rate, callus formation and vitrified flowers have evaluated. In this experimental from a total of 18,900 flower buds cultured, 459 embryos (2.43%), of which all successfully regenerated to complete plants. Gorgan and Mianeh accessions showed the highest embryo and regeneration rate (25%) in culture medium B2D2 (2 mgl^{-1} BA and 2 mgl^{-1} 2, 4-D). Results showed that unpollinated flower culture is an effective method to *in vitro* gynogenesis of Persian leek.

Keywords: Persian leek, Gynogenesis, *In vitro* culture and Unpollinated flower culture.

*Corresponding author: Z. GHAHREMANI E-mail: ghahremani.z@znu.ac.ir