تاثیر کینتین وسطوح مختلف هورمون 2,4-D بر کالوس زایی و باززایی دو ژنوتیپ اسفناج از ریز نمونه برگ

مونا خیاطزاده (۱)، داریوش نباتی احمدی (۲)، حمید رجبی معماری (۲)، محمدرضا عبداللهی (۳)، رسمیه حمید (۱)
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران اهواز، ۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران اهواز، ۳- استادیار گروه اصلاح نباتات دانشگاه بوعلی سینا همدان

اسفناج به دلیل دارا بودن بیشترین تعداد کلروپلاست و همچنین بیشترین تعداد ژنوم در یک کلروپلاست، به عنوان گیاه مدل در مطالعات مربوط به مهندسی کلروپلاست قلمداد می گردد، لذا باززایی این گیاه با مناسب ترین درصد مورد نیاز می باشد. در این پژوهش به منظور بهینه سازی باززایی از ریز نمونه برگ، از هورمون 2,4-D در سه غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر هورمون Kinetin و همچنین از دو رقم Viroflay و Orai استفاده شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین انگیزش کالوس از ریزنمونه برگ هر دو رقم، در محیط حاوی 2,4-D با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر صورت گرفت، که بعد از انتقال به محیط حاوی 2,4-D، Kinetin و GA_3 با غلظت های به ترتیب ۰/۰۱ ، ۲ و ۱ میلی گرم در لیتر، از کالوس های به‌دست آمده از رقم Orai در محیط حاوی ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، باززایی حاصل شد.

کلمات کلیدی: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، باززایی، کالوس، 2,4_D، کینتین (Kinetin).

مقدمه:

اسفناج با نام علمی *Spinacia Oleracea L.* ، متعلق به خانواده ی Chenopodiacea بوده و یک گونه ی گیاهی است که نقش مهمی در تولید تجاری، مطالعات علمی در زمینه کلروپلاست و ... دارد. این گیاه همچنین دارای ارزش غذایی بالایی بوده و یک منبع غنی از آهن، ویتامین آ و مواد معدنی می باشد (٦). یکی از جنبه های مهم فرایند های بیوتکنولوژی گیاهی، کشت میکروارگانیسم ها یا سلول های گیاهی و یا بافت ها در محیط کشت درون شیشه است. موفقیت در بسیاری از تکنیک های گزینش در شرایط این ویترو و اعمال فنون دست ورزی ژنتیکی در گیاهان عالی، به باززایی موفق گیاهان در محیط این ویترو بستگی دارد. گونه های مختلف، ارقام درون گونه و اندام های مختلف یک گیاه، به یک روش کشت بافت واکنش یکسان نشان نمی دهند (۳). در گیاه اسفناج Chin و همکاران باززایی از ریزنمونه برگ را از طریق استفاده از 2,4_D، Kinetin و GA_3 جهت القای کالوس و باززایی و با کاربرد سه تیمار دمایی مختلف ١٤، ٢٠ و ٢٥ درجه سانتی گراد، اجرا نمودند؛ و این نتیجه به دست آمد که کشت کالوس در دمای پایین تر، درصد باززایی بالاتری را نشان می دهد(۲). همچنین در مطالعه ای دیگر مشاهده شد که تولید کالوس از ریزنمونه برگ وابسته به رقم بوده و بالاترین میزان باززایی از کالوس های القا شده در تاریکی به دست آمد (۱). در مطالعه حاضر هدف عمده، بررسی اثر هورمون 2,4_D بر روی کالوس زایی و باززایی از ریز نمونه برگ و مقایسه آن در دو رقم Orai و Viroflay و تعیین بهترین غلظت می باشد.

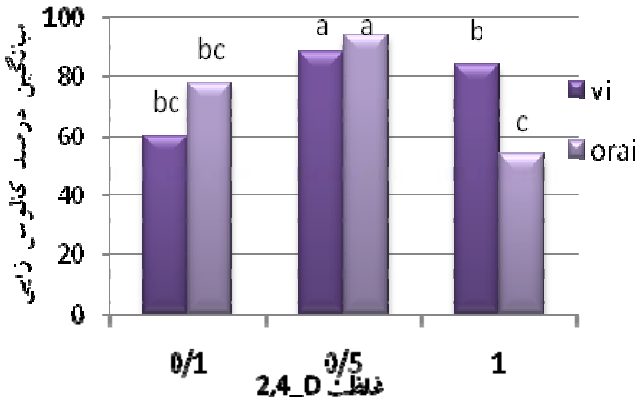
مواد وروش‌ها:

مواد گیاهی بکار رفته در این آزمایش بذر های رقم Orai و Viroflay بودند. این بذرها پس از ضد عفونی در الکل ٪۷۰ به مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ٪ ۵ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت پایه MS (٤) حاوی۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸ به منظور جوانه زنی قرار گرفتند. برگها از گیاهچه های ۲ تا ۳ هفته ای جدا شده و به قطعات ۵ میلی متری تقسیم گشته و بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار و pH معادل ۵/۸ با سه تیمار هورمونی شامل 2,4_D در سه سطح ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی گرم در لیتر در ترکیب با ۲ میلی گرم در لیتر Kinetin، به منظور انگیزش کالوس کشت شدند. این کشت ها در شرایط ۸ ساعت روشنایی و ١٦ ساعت تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل

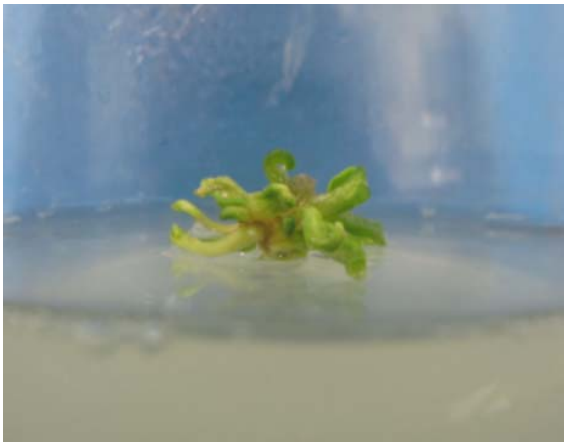
در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تکرار و ۱۰ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. این ریزنمونه ها هر دو هفته یکبار به درون محیط جدید وا کشت می شدند. بعد از دو ماه ارزیابی روی میزان کالوس زایی انجام شد. سپس کالوس ها بر روی محیط باززایی که حاوی 2,4_D، Kinetin و GA_3 به ترتیب با غلظت های ۰/۰۱، ۲ و ۱ میلی‌گرم درلیتر بود، در شرایط ۸ ساعت تاریکی و ١٦ ساعت روشنایی و در دمای ١٤ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

نتایج و بحث:

ریز نمونه های برگ پس از گذشت ۲ ماه تولید کالوس نمودند. نتایج تجزیه واریانس تیمار های مختلف 2,4_D، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار تیمارها در سطح ۰/۰۵ بود. نتایج آزمون دانکن (شکل ۱)، غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر را به عنوان بهترین تیمار کالوس زایی معرفی کرد. تفاوت بین ارقام در این تیمارها معنی دار نبود. ارزیابی اثر متقابل رقم با غلظتهای مختلف 2,4_D نشان داد که در غلظت بالاتر این هورمون، رقم Viroflay نسبت به رقم Orai کارایی بالاتری در تولید کالوس دارد.



شکل ۱. مقایسه میانگینهای کالوس زایی ریزنمونه برگ در غلظت های مختلف 2,4_D



شکل ۲. گیاهچه حاصل از کالوس ریز نمونه برگ در رقم Orai

از کالوس های تولید شده بر روی تیمار اول (۰/۱ میلی‌گرم درلیتر 2,4_D و ۲ میلی‌گرم درلیتر Kinetin) و دوم (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4_D و ۲ میلی‌گرم درلیتر Kinetin) پس از انتقال به محیط باززایی که حاوی به ترتیب ۰/۰۱، ۲ و ۱

میلی‌گرم 2,4_D، kinetin و GA3 بود، در رقم orai باززایی حاصل شد در حالیکه در رقم Viroflay نتیجه ای مشاهد نشد (شکل ۲). که این مورد همان گونه که توسط سازاکی و همکاران مورد تاکید قرار گرفت، نشان از تاثیر زیاد ژنوتیپ بر روی باززایی این گیاه است(۵). **همچنین** افزایش کالوس زایی با کاربرد ۰/۵ میلی گرم در لیتر 2,4_D در ریزنمونه برگ و به دنبال آن تولید گیاهچه در محیط باززایی با نتایج با دست آمده از مطالعات Chin و همکاران مطابقت دارد(۲).

منابع:

1. Al-khayri, J.M., Huang, F., Morelock, T., Busharar, T.A., Gbur, E.E., 1991. Genotype-dependent response of spinach cultivars to in vitro callus induction and plant regeneration. Plant Science, 78: 121-127.
2. Chin, D.P., Bao, J.H., Mii, M., 2009. Transgenic spinach plants produced by Agrobacterium-mediated method based on the low temperature-dependent high plant regeneration ability of leaf explants. Plant Biotechnology, 26: 243-248.
3. Farsi, M., Zolala, J., 1382. Introduction to Plant Biotechnology, 392, Ferdowsi University Of Mashhad publication, The Iran, p. 495.
4. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 473-497.
5. Sasaki, H., M. Ohta and M. Ono. 1989. Effect of gibberellin concentration and cultivar on adventitious bud formation of spinach hypocotyl tissue cultured *in vitro*. J. Hokkaido Univ. Esuc (IIB). 40: 73- 80.
6. Swiader, J.M., Ware, G.W., Mccollum J.P., 1992. Producing Vegetable Crops. Interstate Publishers, Danville, Illinois.