مقایسه تاثیر هورمونهای IAA و GA_3 بر کالوس زایی و باززایی از ریز نمونه هیپوکوتیل در دو ژنوتیپ اسفناج

مونا خیاطزاده (۱)، داریوش نباتی احمدی (۲)، حمید رجبی معماری (۲)، محمدرضا عبداللهی (۳) و یاسین معزز (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

به منظور دست یابی به ژنوتیپ مناسب و محیط غذایی مؤثر جهت باززایی گیاه اسفناج، پاسخ ریزنمونه برگ از بذر های دو ژنوتیپ Orai و Viroflay بر روی محیط کشت پایه MS با ترکیبات متفاوت از هورمون های IAA و GA_3 بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی اجرا شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان کالوس دهی برای هر دو رقم در محیط حاوی ۸/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در ترکیب با ۰/۳٤ و ۳/٤ میلی‌گرم در لیتر GA_3 می باشد. پس از انتقال کالوس ها به محیط باززایی حاوی IAA و GA_3 به ترتیب با غلظت‌های ۲ و ۳/٤ میلی‌گرم در لیتر، کالوس های تولید شده بر روی محیط حاوی ۸/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA در رقم Viroflay تولید گیاهچه نمودند.

کلمات کلیدی: اسفناج (*Spinacia oleracea* L.)، باززایی، کالوس، ایندول استیک اسید (IAA)، جیبرلیک اسید (GA_3).

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). وجود باززایی موثر و با تکرارپذیری قابل قبول یکی از ضروریات اولیه برای تراریخت نمودن ژنتیکی و ایجاد یک ژرم پلاسم جدید محسوب می شود. بطوریکه اگر ژنی با موفقیت به سلولهای گیاهی منتقل شده و حتی بیان شود، ولی باززایی گیاه امکانپذیر نباشد به لحاظ اصلاحی ارزش چندانی ندارد. در زمینه کشت بافت اسفناج، طبق پژوهشی که سازاکی و همکاران با استفاده از ریزنمونه هیپوکوتیل انجام دادند یک سیستم اندام زایی را بهینه نموده که در آن ترکیب محیط کشت برای کالوس زایی و باززایی یکسان و بدون واکشت بوده و حاوی ۱ میلی‌گرم درلیتر IAA و ۰/۰۱ میلی‌گرم درلیتر Zeatin می باشد (۵). همپنین در پژوهشی دیگر مشخص شد که کشت این ریزنمونه ها در در محیط حاوی ۱۵ میلی‌گرم درلیتر 5,6-cl_2-IAA بالاترین میزان جوانه زنی را دارد (۲). کاربرد سطوح بالای GA_3 در تیمار کالوس زایی اندازه کالوس ها را در این گیاه کاهش داد (۱). در این مطالعه اثرات ترکیبات هورمونی IAA و GA_3 بر روی کالوس زایی و باززایی دو ژنوتیپ Orai و Viroflay گزارش شد.

مواد و روش‌ها:

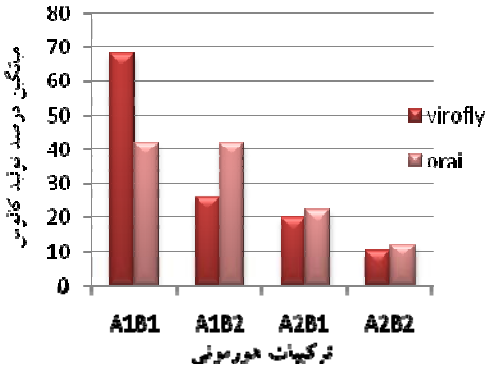
مواد گیاهی بکار رفته در این آزمایش بذر های رقم Orai و Viroflay بوده که پس از ضد عفونی در الکل ٪۷۰ به مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ٪ ۵ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت پایه MS (۳) حاوی۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸ به منظور جوانه زنی قرار گرفتند. ریزنمونه هیپوکوتیل از گیاهچه های ٤ روز جدا شده و بر روی محیط کشت حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار با pH=٦ با چهار ترکیب هورمونی شامل ۸/۵ و ۱۵ میلی گرم در لیتر IAA (A1 و A2) و ۰/۳٤ و ۳/٤ میلی گرم در لیتر GA_3 (B1 و B2) جهت تولید کالوس قرار گرفتند. این کشت ها یک هفته در تاریکی، در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد، سپس دو هفته در ۸ ساعت روشنایی با دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و در نهایت یک ماه در شرایط ١٦ ساعت روشنایی قرار داده شدند. پس از این مدت میزان تولید کالوس ارزیابی شده و ریز نمونه ها همراه با کالوس ها بر روی محیط باززایی که حاوی

۲ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۳/٤ میلی‌گرم در لیتر GA_3 بود در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و دمای ۱±۲٤ ، انتقال یافتند. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار آماری SAS و SPSS انجام شد.

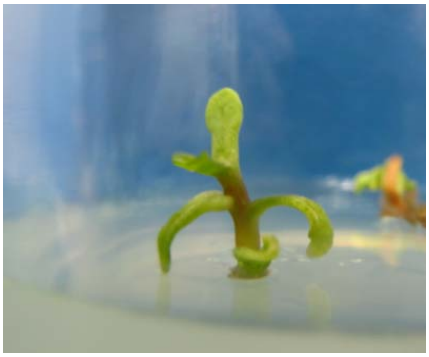
نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس حاصل از داده های کالوس زایی از هیپوکوتیل نشان داد که بین سطوح مختلف IAA در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی دار وجود دارد. با توجه به همبستگی منفی بین غلظت IAA و درصد کالوس دهی، کاربرد میزان پایین این هورمون (۸/۵ میلی گرم در لیتر) در هر دو رقم افزایش کالوس زایی را در بر داشت (شکل ۱). اثرات متقابل تاثیر معنی داری را در این آزمایش نشان ندادند. پس از انتقال کالوس ها به محیط باززایی حاوی ۲ میلی گرم در لیتر IAA و ۳/٤ میلی گرم در لیتر GA3، کالوس های حاصل از تیمار A1B1 (۸/۵ IAA + $GA_3$۰/۳٤) و A1B2 (۸/۵ IAA + ۳/٤ GA_3) در رقم Viroflay تولید گیاهچه نمودند اما در رقم Orai باززایی حاصل نشد (شکل ۲).

در این پژوهش کاربرد ۸/۵ میلی گرم در لیتر IAA در کالوس زایی و باززایی از ریز نمونه هیپوکوتیل بعنوان موثرترین تیمار بوده است، اما در سایر پژوهش ها بیشترین باززایی با کاربرد ۱۵ میلی گرم در لیتر IAA حاصل شده است (۲، ٤). که این تفاوت می تواند دلیل بر اثر بالای ژنوتیپ در کالوس زایی و باززایی این گیاه باشد که توسط سازاکی و همکاران مورد تاکید قرار گرفت(٤). زیااو و براچارد میزان کالوس زایی از هیپوکوتیل را روی ترکیبات متفاوت از هورمون IAA و GA_3 یکسان گزارش نمودند در حالیکه در این مطالعه غلظت پایین تر IAA تاثیر بیشتری روی کالوس زایی داشت(۷).



شکل۱. میانگین درصد کالوس زایی از ریزنمونه هیپوکوتیل در ترکیبات هورمونی مختلف



شکل۲. گیاهچه حاصل از کالوس در رقم Viroflay

منابع:

7. Kabiri, M., Meybodi, A., Shakib, A., Rezaii, A., 1384. Callogenesis and regeneration of plant in spinach. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. 4: 153-158**.**
8. Mii, M., Naako, M., Okuda, K., Iizuka, M., 1992. Shoot regeneration from spinach hypocotyls by shotr term treatment with 5.6-dichloro-indole-3-acetic acid. Plant Cell Rep. 11: 58-61.
9. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15: 473-497.
10. 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.
11. Sasaki, H., Nakai, S., Kubouchi, H., 1986. Organ formation of spinach hypocotyl tissues cultured in vitro. J. Hokkaido Univ. Edvc. 37: 49-56.
12. Swiader, J.M., Ware, G.W., Mccollum J.P., 1992. Producing Vegetable Crops. Interstate Publishers, Danville, Illinois.
13. Zhang, H.X., Zeevaart, J.A.D., 1999. An efficient Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea L.*). Plant Cell, Rep. 18: 640-645.