

بهینه سازی سیستم کالوس زایی در ۳ رقم گوجه فرنگی به منظور انتقال ژن

بهنوش سلطان محمدی (۱)، مختار جلالی جواران (۲)، حمید رجبی معماری (۳)

۱- دانشجوی بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، ۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات دانشگاه تربیت مدرس، ۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید چمران اهواز

گوجه فرنگی یکی از مهمترین سبزیجات و گیاه مدل جهت اصلاح سایر گیاهان دولپه‌ای است. لذا کالوس زایی با درصد بالا جهت استخراج متابولیت‌های ثانویه، انتقال ژن به کالوس، تولید پروتئین‌های نو ترکیب و باززایی غیر مستقیم و در این گیاه مورد نیاز می باشد. در این پژوهش به منظور بهینه سازی کالوس زایی از ریزنمونه کوتیلدونی ۳ رقم گوجه فرنگی که در ایران در بین ارقام دارای بیشترین سطح زیر کشت هستند، استفاده شد. آزمایش‌های جداگانه به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور رقم در ۳ سطح (اوربانا، کلجی، ریو گرند) و محیط کشت پایه MS با ترکیبات مختلف از هورمون‌های NAA و BAP در سطوح مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین انگیزش کالوس از ریزنمونه کوتیلدون دو رقم ریوگرند و کلجی، در محیط حاوی BAP با غلظت ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر و NAA با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر صورت گرفت و همچنین اثرات متقابل رقم و تیمار هورمونی در سطح ۰/۰۵ معنی دار شد.

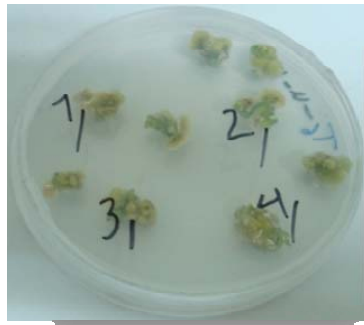
کلمات کلیدی: گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*)، کالوس زایی، کشت بافت

مقدمه:

گوجه فرنگی زراعی (*Lycopersicon esculentum*) از خانواده Solanaceae بوده و یکی از مهمترین سبزیهای مشهور دنیا می باشد که به علت داشتن انواع ویتامینها، کاروتن، اسیدهای آمینه مفید، قند و املاح معدنی، نقش مهمی در سلامت انسان ایفا می کند. میوه این گیاه به صورت مختلف در تغذیه مورد مصرف قرار می گیرد. این گیاه ممکن است یکساله یا چند ساله باشد (۲). گوجه فرنگی سرشار از آنتی اکسیدان است و انسان را در برابر رادیکالهای آزاد حفاظت می کند. گوجه فرنگی به عنوان پیشگیری کننده ی سرطان شناخته شده است. کشت بافت به عنوان یکی از شاخه‌های بیوتکنولوژی، کاربرد گسترده‌ای در کشاورزی دارد (۶). گوجه فرنگی یکی از مهمترین سبزیجات و گیاه مدل جهت اصلاح سایر گیاهان دولپه‌ای است (۵و۴). وجود کالوس زایی موثر و با تکرارپذیری قابل قبول یکی از ضروریات اولیه برای استخراج متابولیت‌ها ی ثانویه مورد نظر از کالوس های تراریخت محسوب می شود. بطوریکه اگر ژنی با موفقیت به سلولهای گیاهی منتقل شده و حتی بیان شود، ولی کالوس زایی گیاه امکان پذیر نباشد به لحاظ اصلاحی ارزش چندانی ندارد. لذا لزوم بهینه سازی شرایط کشت بافت جهت انجام کالوس زایی با راندمان بالا پس از انتقال ژن، یکی از پیش نیازهای اساسی در این زمینه خواهد بود. گونه های مختلف، ارقام درون گونه ای گوجه فرنگی به یک روش کشت بافت واکنش یکسان نشان نمی دهند (۱). در مطالعه حاضر هدف عمده، کالوس زایی از ریزنمونه های سه رقم اوربانا، کلجی و ریو گرند می باشد که با توجه به تهیه ی محیط کشت های متفاوت از طریق هورمون های مختلف، بتوان ریز نمونه ها را کالوس زایی کرد تا در مراحل انتقال ژن به سلولهای این گیاه مدل و با ارزش اقتصادی بالا استفاده شود.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی بکار رفته در این آزمایش بذر های رقم اوربانا، کلجی و ریوگرند بوده که پس از ضد عفونی در الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و سپس چندین بار شستشو با آب مقطر استریل، بر روی محیط کشت پایه MS (۳) حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۸ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۵/۸ به منظور جوانه زنی قرار گرفتند. کوتیلدونها از گیاهچه های ۹ تا ۱۲ روزه جدا شده و پس از قطع ابتدا و انتهای برگ و ایجاد خراشهای سطحی بر روی محیط کشت پایه MS حاوی ۶ تیمار هورمونی شامل ۲ سطح ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۳ سطح ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر NAA، کشت شدند. این کشت ها در شرایط ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با ۴ تکرار و ۹ ریزنمونه در هر تکرار انجام شد. این ریزنمونه ها هر سه هفته یکبار به درون محیط جدید واگشت می شدند. بررسی ها ۴۵ روز پس از کشت اولیه انجام شد و میزان انگیزش کالوس مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با نرم افزار آماری MSTATC انجام شد.



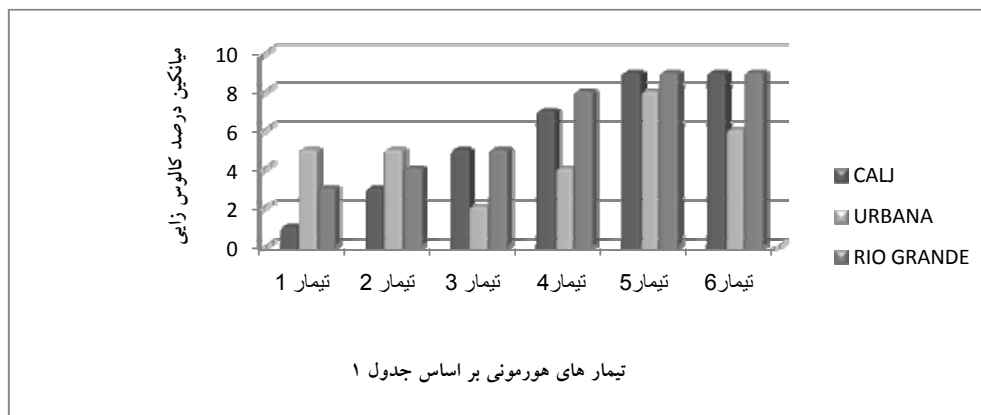
| هورمون تیمار | BAP | NAA |
|-----------------|-----|-----|
| تیمار ۱ | ۱ | ۰ |
| تیمار ۲ | ۲ | ۰ |
| تیمار ۳ | ۱ | ۰/۱ |
| تیمار ۴ | ۲ | ۰/۱ |
| تیمار ۵ | ۱ | ۰/۵ |
| تیمار ۶ | ۲ | ۰/۵ |

شکل ۱- کالوس زایی در ریز نمونههای گوجه فرنگی

جدول ۱- تیمارهای هورمونی

نتیجه و بحث:

ریز نمونه های کوتیلدون پس از گذشت ۱ ماه کالوس تولید نمودند. نتایج تجزیه واریانس تیمار های مختلف BAP و NAA بیانگر وجود اختلاف معنی دار تیمارها در سطح ۰/۰۵ بود. نتایج آزمایشها غلظت ۱ و ۲ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی گرم NAA را به عنوان بهترین تیمار کالوس زایی معرفی کرد. تفاوت بین ارقام در سطح ۰/۰۵ معنی دار بوده و رقم ریوگرند و سپس کلجی و در آخر اوربانا بهترین انگیزش کالوس را ایجاد کرده اند. ارزیابی اثر متقابل رقم با غلظتهای مختلف BAP و NAA نشان داد که در تیمار هورمونی ذکر شده، رقم ریوگرند و کلجی نسبت به اوربانا کارایی بالاتری در تولید کالوس دارند ولیکن تفاوت معنی داری بین ۲ رقم ریوگرند و کلجی مشاهده نشد (نمودار ۱)



نمودار ۱ - اثرات متقابل رقم و تیمارهای هورمونی

منابع:

- 1- Daneshvar, M.H., 1379, Vegetables nurture. 190, Chamran University Of Ahvaz publication, p.461.
- 2- Farsi, M., Zolala, J., 1382. Introduction to Plant Biotechnology, 392, Ferdowsi University Of Mashhad publication, The Iran, p. 495.
- 3- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- 4- Ling, H.Q., Kriseleit, D., Ganal, M.G., 1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*L. esculentum* Mill.). *Plant Cell Rep* 17: 843-847.
- 5- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., and Fraley, R., 1986. Leaf disk transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 5: 81-84.
- 6- Bagheri, A.R., Moshtaghi, N., Sarifi, A., 1386. Plant biotechnology. Ferdowsi University Of Mashhad publication, p.23

Improvement Of Callus Induction System In 3 Cultivars Of Tomato For Gene Transferring

Soltanmohammadi B^{1*}, Jalali Javaran M², Rajabi Memari H³.

Abstract:

Tomato is one of the most important vegetables and model plant for plant breeding in dicotyledons. Therefore callus induction with high percent needs for extraction of secondary metabolites, Gene transferring to callus, produce of recombinant protein, indirect regeneration. In this study, the cotyledons explants of three most popular cultivars of tomato were used for improvement of callus induction. A factorial experiment on basis of complete randomized design (CRD) analyzed on a factorial with completely randomized design with 2 factors, 3 cultivars (Urbana, Calj, Rio grand) and basal culture medium (MS) with different ingredients of NAA and BAP hormones. The results showed that the most callus induced from cotyledons in Rio grande & Calj cultivars, in medium with 1 & 2 mg/lit of BAP and 0.5 mg/lit of NAA. Cultivars have different reactions to different ingredients of hormones and the difference is significant in 0.05 level.

Key words: Tomato (*Lycopersicon esculentum*), Callus induction, Tissue culture