باززایی مستقیم شاخساره از برگ گیاه اطلسی

مریم جمشیدنیا ، سیروس قبادی، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی، احد یامچی
گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

بهینه سازی باززایی گیاه اطلسی برای چند رقم ایرانی و خارجی با استفاده از قطعات برگ با هدف انتقال ژن از طریق اگروباکتریوم صورت گرفت. در این بررسی برای مطالعه کشت بافت از طریق قطعات برگ، ریزنمونه های برگ ارقام مختلف در ۳ نوع محیط کشت MS تغییر یافته (نمک های MS حاوی ویتأمین های B_5) که دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار به همراه تنظیم کننده های رشد مختلف ۰/۱ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین برای محیط کشت MS_1 قرار داده شد. ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA برای محیط کشت MS_2 بکار رفت. ۲ میلی گرم در لیترBAP، ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر زاتین برای محیط کشت MS_3 استفاده شد. تعداد شاخه های تولید شده به صورت مستقیم و غیرمستقیم (از کالوس) یادداشت برداری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و تجزیه و تحلیل آماری داده ها با نرم افزار SAS انجام شد. نتایج نشان داد که بهترین محیط کشت برای باززایی مستقیم تمام ارقام محیط کشت MS_3 می باشد.

کلمات کلیدی: اطلسی، باززایی، قطعات برگ.

مقدمه:

اطلسی اولین گیاهی است که به عنوان پوشش گیاهی فضای سبز استفاده شده است و واریته‌های جدیدی از این گیاه امروزه نیز تولید می شود که در صنعت گیاهان حاشیه‌ای دارای اهمیت فوق العاده ای است (۱).

کشت بافت و سلول گیاه مقدمه‌ای برای انتقال ژن و مهندسی ژنتیک محسوب می گردد (۲)، بنابراین قبل از انتقال ژن یا ژن-های مطلوب بهینه سازی باززایی گیاه اطلسی یک شرط اساسی می باشد. در روش جنین زایی سوماتیکی، جنین‌های رویشی به دلیل شباهت بسیار زیادی که به جنین‌های جنسی دارند از قابلیت مناسبی برای تبدیل به یک گیاه کامل برخوردارند (۳). در این روش از عواملی که در تشکیل کالوس و باززایی موثر هستند می توان به اثر ژنوتیپ، نوع ریزنمونه و محیط کشت اشاره کرد، که در این میان ژنوتیپ نقش بسیار مهمی در باززایی دارد (٤)، زیرا تنوع در میان ارقام اطلسی در تولید ساقه درون شیشه‌ای مشاهده می شود. روش باززایی از طریق کشت پروتوپلاست نیز برای بدست آوردن هیبریدهای سوماتیکی مناسب است ولی دارای محدودیت‌هایی برای کاربرد در انتقال ژن می باشد (۵).

بر این اساس در این پژوهش بهینه سازی باززایی گیاه اطلسی از طریق برگ در ارقام ایرانی و خارجی با هدف مقدمه ای برای انتقال ژن صورت گرفت.

مواد و روش‌ها:

برگ‌های جوان و کاملاً گسترده گیاه اطلسی ارقام خارجی و ایرانی که در شرایط درون شیشه کشت شده بودند به قطعاتی تقسیم و در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۵ نمونه در محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS) تغییر یافته (نمک‌های MS حاوی ویتامین‌های B_5) که دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۷ گرم در لیتر آگار به همراه تنظیم کننده‌های رشد مختلف ۰/۱ میلی گرم در لیتر نفتالین استیک اسید و ۲ میلی گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین برای محیط کشت MS_1 قرار داده شد. ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA[۱] برای محیط کشت MS_2 بکار رفت. ۲ میلی گرم در لیترBAP [۲]،

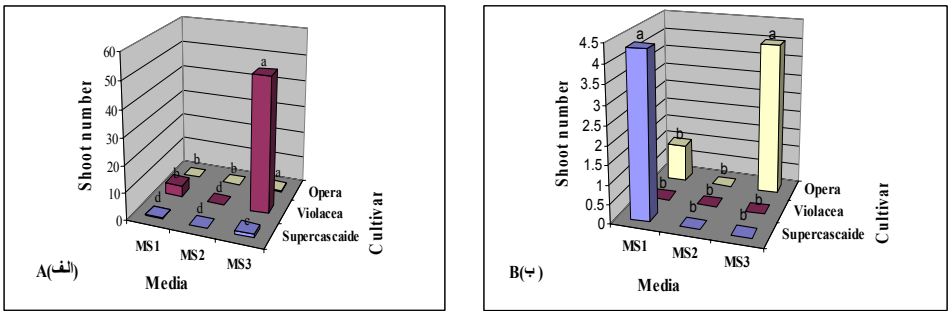
1-Naphthalenacetic acid
2-6-Benzylaminopurine
3- Zeatin

۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA و ۱ میلی گرم در لیتر زاتین[۳] برای محیط کشت MS_3 استفاده شد. کشت‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی گراد و ۱٦ ساعت روشنایی با شدت ٤۰ $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ نگهداری شدند. به منظور ریشه زایی، ساقه‌ها از قطعات برگ جدا شده و در محیط ریشه زا (نمک‌های MS حاوی ویتامین‌های B_5 که دارای ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بود) ،قرار داده شدند.

نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر رقم و محیط کشت به تنهایی و برهمکنش آن‌ها در تولید تعداد شاخه‌های مستقیم در سطح یک درصد معنی دار بود. این نتایج همچنین نشان داد که اثر رقم، اثر محیط کشت و برهمکنش رقم×محیط کشت در سطح یک درصد در تولید تعداد شاخه‌های غیر مستقیم معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین های اثر رقم (اطلاعات نشان داده نشده است) نشان داد که رقم ایرانی بیشترین تعداد شاخه مستقیم را در میان ارقام دیگر ایجاد کرد. همچنین گزارشات محققین دیگری نیز وجود دارد که اعلام نموده بودند باززایی از طریق جنین زایی سوماتیکی به ژنوتیپ وابسته است (۵).

نتایج مقایسه میانگین‌های اثر محیط کشت (اطلاعات نشان داده نشده است) نشان داد که محیط کشت MS_3 در تولید تعداد شاخه‌های مستقیم مؤثرتر از بقیه محیط‌ها بود. این نتایج با یافته‌های بوژان[۱٤] و همکاران (٦) که اظهار داشتند استفاده از زاتین در محیط کشت باززایی سیب زمینی سبب کاهش تشکیل کالوس می شود مطابقت داشت. به نظر می رسد که وجود تنظیم کننده رشد زآتین در محیط کشت در باززایی شاخه‌های مستقیم مؤثر است و همچنین استنباط می شود که حذف این تنظیم کننده رشد از محیط کشت موجب افزایش تشکیل کالوس می گردد که البته در این امر برهمکنش رقم و تیمار نیز نقش بسزایی ایفا می کند به طوری که شکل ۱(الف و ب) نشان می دهد، رقم ایرانی در محیط MS_3 بیشترین تعداد شاخه مستقیم (با میانگین ۵۰/۵) و رقم اوپرا در این محیط بیشترین تعداد شاخه غیر مستقیم (با میانگین ٤) را ایجاد کرد.



شکل ۱ برهمکنش محیط کشت و رقم بر تولید شاخه‌های مستقیم (الف) و غیر مستقیم (ب) حاصل از ریزنمونه برگ.

منابع:

1. Gerats, T. M. Vandenbussche. 2005. A model system for comparative research: Petunia. Trends in plant science. 10(5): 251-256.
2. Hussey, G. 1978. Hormones and production in tissue culture. Brit. Plant Growth Regulator Group. Monograph 2: 19-28.
3. Choi, H. W. P. G. Lemaux and M. J. Cho, 2000. Increased chromosomal variation in transgenic barley (Hordeum vulgar) plants. Invitro cell. Development. Biology. 37:217-222
4. Qaoud, H. A. A. A. Rayya. and S. Yaish. 2010. Invitro regeneration and somaclonal variation of petunia hybrida. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 18(1):71-81.

۱- Beaujean

5. Rout, G. R. A. Mohapatra and S. M. Jain. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects, Biotechnology Advances. 24: 531-560.
6. Beaujean, A. R. S. Sangwan. A. Lecardonnel and B. S. Sangwan-Noreel. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation. Journal of Experimental Botany. 49:1589-1595.

DIRECT REGENERATION FROM LEAF DISC CULTURE OF PETUNIA

M. JAMSHIDNIA, C. GHOBADI, B. E. SAYED TABATABAEI, A. YAMCHI
Department of Biotechnology, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111 Iran.

Abstract
Optimizing regeneration for Iranian and foreign cultivars of petunia plant via leaf disc explants was done in order to use in further *Agrobacterium*-mediated transformation studies. In order to optimize regeneration via leaf disc, leaf discs from petunias *in vitro* culture were cut to 10×10 mm in size, and then were put in 3 modified MS media: 2mg/l BAP+1mg/l Zea+0.1mg/l NAA (MS_3), 2mg/lBAP+0.1mg/l NAA (MS_1), and 1mg/l NAA (MS_2) in three replicates. The number of direct and indirect shoots was analyzed in a completely randomize design (CRD). Result showed that the best medium for direct regeneration was MS_3 medium.
Key words: Petunia, Regeneration, leaf disc.