باززائی گیاهچه از پروتوپلاست زعفران

مهدی آهوران (۱)، رامین حسینی (۱)، رضا ضرغامی (۲)
۱- بخش مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین،
۲- بخش کشت بافت و تراریختی ژن، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

زعفران محصولی تریپلوئید و عقیم بوده که توسط بنه‌های در حال استراحت تکثیر می‌گردد، لذا بهبود خصوصیات زراعی آن توسط روش‌های قدیمی دشوار است. کشت پروتوپلاست ابزار مناسبی برای بهبود خصوصیات زراعی آن می‌باشد. در تک لپه‌ای‌هایی همچون زعفران، باززائی گیاهچه از پروتوپلاستی که به صورت مستقیم از اندام های گیاهی جدا می‌شود دشوار است لذا کالوس‌های رویان زا، بهترین منبع برای استخراج پروتوپلاست می‌باشند. برای جداسازی پروتوپلاست، از محلول آنزیمی شامل محیط کشت MS حاوی 0.2٪ پکتولیاز Y-2-3، 2٪ سلولازRS، 0/5٪ دریزلاز، 0/05٪ MES، و مانیتول 0/3 مولار به مدت۳ ساعت در تاریکی و دمای ۲۲ درجه سانتی گراد استفاده شد. پروتوپلاست جدا شده به آرامی با محلول سدیم آلژینات سترون مخلوط شد و مخلوط حاصل قطره قطره با پیپت پاستور به محیط کشت MS مایع حاوی کلرید کلسیم 1٪ و مانیتول 0.3 مولار اضافه گردید تا گلوله‌های کلسیم آلژینات تشکیل گردد. گلوله‌های کلسیم آلژینات به محیط کشت مایع MS حاوی غلظت های مختلف هورمونی منتقل شدند. بعد از گذشت ۴ تا ۵ هفته از کشت، میکروکالوس‌ها بر سطح گلوله‌های کلسیم آلژینات پدیدار شدند. با گذشت ۶ ماه از انتقال میکروکالوس‌ها به محیط کشت جامد MS بدون تنظیم کننده رشد حاوی ۶٪ ساکارز، باززائی گیاهچه صورت گرفت.

واژه‌های کلیدی: زعفران، کلسیم آلژینات، کشت پروتوپلاست، باززائی گیاهچه

مقدمه:

کشت بافت زعفران اولین بار توسط دینگ و همکاران (1978) گزارش شد آنها با کشت قطعات سطحی بنه، جوانه به دست آورند. دینگ و همکاران (1981) با محیط کشت MS و هورمون‌های 2,4-D، Kin، و NAA موفق به القای کالوس بر قطعات بنه و ایجاد گیاهچه از کالوس‌ها شدند. ابراهیم زاده و همکاران (2000a) با کشت مریستم در محیط LS و نیز استفاده از غلظت‌های مختلفی از اکسین‌ها و سایتوکینین‌ها، رویانزائی بدنی را القاء و مراحل بلوغ رویان‌ها را مشاهده نمودند، رویان‌های بالغ پس از انتقال به محیط 1/2 MS حاوی جیبرلین، جوانه زده و در محیط 1/2 MS حاوی هورمون‌های BAP و NAA، گیاهچه کامل دارای بنه را ایجاد نمود. ابراهیم زاده و همکاران (2000b) در تحقیقی دیگر از پروتوپلاست‌های حاصل از بافت کالوس ایجاد شده بر قطعات جدا کشت بنه زعفران، ساختارهای برگی بوجود آوردند.

مواد و روش‌ها:

با توجه به آنکه در تک لپه‌ای‌هایی همچون زعفران، باززائی گیاهچه از پروتوپلاستی که به صورت مستقیم از اندام های گیاهی جدا می‌شود دشوار است و پروتوپلاست‌های به دست آمده از این اندام‌ها در باززائی و تولید گیاهچه کامل اغلب ناتوان می‌باشند لذا از کالوس‌های رویانزا برای استخراج پروتوپلاست در این تحقیق استفاده شد.
ضد عفونی مواد گیاهی

ضد عفونی بنه‌های زعفران بدین صورت انجام شد که، ابتدا فلس‌های روی بنه‌ها بطور کامل برداشته شدند و به مدت 30 دقیقه جهت حذف گرد و غبار و آلودگی‌های سطحی با آب جاری شستشو شده سپس در محلول کلرید جیوه 0/15٪ به مدت 10 دقیقه قرار گرفتند، و در مرحله آخر بنه‌ها 3-2 مرتبه توسط آب مقطر سترون به خوبی شستشو شدند.

کشت ریز نمونه جهت القای کالوس رویانزا

جهت به دست آوردن کالوس‌های رویانزا از قطعات بنه به عنوان ریز نمونه استفاده شد. ریز نمونه‌ها در محیط کشت پایه MS به همراه 30 گرم در لیتر ساکارز و تنظیم کننده‌های رشد NAA و BAP با غلظت های 0، 0/5، 1، و 2 میلی گرم در لیتر در 16 ترکیب هورمونی قرار داده شدند. کشت در شرایط تاریکی و در دمای 2± 22 درجه سانتی‌گراد انجام شد و هر ماه واکشت صورت گرفت. بررسی نتایج مربوط به القای کالوس پس از دو ماه انجام شد.

جداسازی و کشت پروتوپلاست

از کالوس‌های رویانزای تشکیل شده در ابتدای مرحله گویچه‌ای برای جداسازی پروتوپلاست‌ها استفاده شد. برای این منظور کالوس‌های رویانزای مرحله گویچه‌ای از ریزنمونه‌ها جدا و در محلول آنزیمی شامل محیط MS حاوی 0/2٪ پکتولیاز(W/V)، 2٪ سلولاز RS، 0/5٪ دریزلاز، 0/05٪ MES، و مانیتول 0/3 مولار به مدت 3 ساعت روی شیکر افقی با سرعت 50 دور در دقیقه قرار داده شدند. مخلوط تیمار شده پس از عبور از فیلترهای با منافذ 50 میکرون به مدت 5 دقیقه در 100گرم سانتریفیوژ گردید. پس از دو مرحله شستشو، پروتوپلاست‌های به دست آمده از نظر قابلیت حیات مورد بررسی قرار گرفتند بدین منظور از فلوئورسین دی استات (FDA) استفاده شد. پروتوپلاست‌های تهیه شده در تراکم 1×10^5 میلی‌لیتر با آرامی با محلول سدیم آلژینات سترون (2٪) در مانیتول 0/3 مولار مخلوط گردیدند. محلول سدیم آلژینات به همراه پروتوپلاست‌ها توسط پیپت پاستور، قطره قطره به محیط مایع MS حاوی 1٪ کلرید کلسیم و مانیتول 0/3 مولار اضافه گردید. گلوله های کلسیم آلژینات بلافاصله در محیط تشکیل و فرایند کپسوله شدن طی مدت 20-15 دقیقه کامل شد. گلوله‌های تشکیل شده در محیط مایع MS حاوی 0/3 مولار مانیتول و غلظت‌های مختلفی از BAP و NAA قرار داده شدند. کشت در شرایط تاریکی و در دمای 2± 22 درجه سانتی‌گراد انجام شد و هر دو هفته با محیط تازه واکشت صورت گرفت.

نتایج و بحث

بیشترین فراوانی کالوس‌های رویانزا (95٪) در تیمار هورمونی یک میلی‌گرم در لیتر از هورمون های BAP و NAA مشاهده شد، در سایر تیمارهای هورمونی درصد القای کالوس‌های رویانزا کمتر بود. کالوس‌های رویانزای ابتدای مرحله گویچه‌ای، بهترین منبع برای استخراج پروتوپلاست تشخیص داده شدند. پس از به پایان رسیدن مدت زمان تیمار آنزیمی، پروتوپلاست ها از نظر قابلیت حیات مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که 98٪ پروتوپلاست‌های به دست آمده زنده و دارای قابلیت حیات می‌باشند. برای کشت پروتوپلاست از روش تثبیت در گلوله‌های کلسیم آلژینات در تیمارهای مختلف هورمونی استفاده شد، مشاهده گلوله‌ها در زیر میکروسکوپ وارونه نشان داد که اغلب پروتوپلاست‌ها ظرف مدت 5-4 روز دیواره سلولی را سنتز کرده و آماده تقسیم سلولی می‌شوند. نتایج نشان داد که استفاده از روش تثبیت در گلوله های کلسیم آلژینات روش موثری بوده زیرا این ماده علاوه بر تغذیه پروتوپلاست، دارای نقش محافظتی نیز می‌باشد. واکشت این گلوله‌ها در محیط کشت دارای فشار اسمزی کمتر منجر به افزایش تقسیم سلولی و رشد ریز توده‌ها گردید و این کاهش جهت کشت موفقیت آمیز پروتوپلاست ضروری است. پس از گذشت 5-4 هفته تشکیل میکروکالوس در سطح گلوله‌ها مشاهده گردید. بالاترین میزان تشکیل میکروکالوس در محیط یک میلی‌گرم در لیتر

هورمون های BAP و NAA صورت گرفت. بعد از تیمار فوق تیمار 2 میلی‌گرم در لیتر NAA و یک میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین نقش را در القای میکروکالوس‌ها ایفا نمود. در این میان تیمارهایی که فاقد یک نوع از تنظیم کننده‌های رشد بودند عکس العمل مناسبی در قبال القای میکروکالوس از خود نشان ندادند. انتقال گلوله ها در این مرحله به محیط جامد حاوی ترکیبات هورمونی مشابه منجر به افزایش رشد کالوس‌ها گردید. کالوس‌های ایجاد شده در محیط‌های جامد حاوی ترکیبات هورمونی به محیط بدون تنظیم کننده رشد MS حاوی 6٪ ساکارز انتقال یافتند که منجر به بلوغ کامل رویان‌ها و در نهایت تشکیل گیاهچه بعد از گذشت 6 ماه گردید.

منابع

۱. Ding, B.Z., H.S. Bai, Y. Wu, and B.K. Wang. ۱۹۷۹. Preliminary report on tissue culture of corms of Crocus sativus L. Acta Bot. Sin. ۲۱:۳۸۷.

۲. Ding, B.Z., H.S. Bai, Y. Wu, and X.P. Fan. ۱۹۸۱. Induction of callus and regeneration of plantlets from corm of Crocus sativus L. Acta Bot. Sin. ۲۳:٤۱۹–٤۲۰.

۳. Ebrahimzadeh,H., R. Karamian, and M.R Noori-Daloii. ۲۰۰۰a. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlet in saffron, Crocus sativus L. J. Sci. I. R. Iran ۹: ۱–۷.

٤. Ebrahimzadeh, H., R. Karamian, and M.R Noori-Daloii. ۲۰۰۰b. Shoot regeneration from saffron protoplasts immobilized in Ca-alginate beads. J. Sci. I. R. Iran ۹:۸–۱۳.

Regeneration of plantlet from protoplast of *Crocus sativus* L.

M. Ahouran[1], R. Hosseini[1], and R. Zarghami[2]

1- Department of Agricultural Biotechnology Engineering, College of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran 2- Department of Tissue culture and Gene Transformation, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

Abstract

Saffron is a triploid and sterile crop that propagated by replanting rest corms thereby it is difficult that we can improvement properties of its agronomic by old methods. Protoplast culture is an efficient instrument for improvement properties of its agronomic. In monocots such as saffron plantlet regeneration from protoplast that isolated directly from the plant's organs is difficult therefore embryogenic callus proved to be the best source for protoplast isolation. Protoplast isolation was directly from embryogenic callus for ۳ hour in an enzyme solution consisting of MS medium, ۰.۲% Pectolyase Y-۲-۳, ۲% Cellulase RS, ۰.٥% Deriselase, ۰.۰٥% MES, and ۰.۳ M mannitol in the darkness at ۲۲ºC. Isolated protoplast was mixed slowly with steril sodium alginate and was added drop by drop with a sterile pasteur pipette to liquid MS medium which was contained $CaCl_2$ ۱% and ۰.۳ M manitol to create Ca-alginate beads. The beads were transferred to MS liquid medium culture with different concentration of growth regulators. After ٤–٥ weeks of culture, microcalli appeared on the surface of the Ca-alginate beads. Plantlet regeneration was occurred when beads transferred onto solid MS medium without growth regulators with ٦% sucrose after ٦ months.

Key words*:* Saffron, Ca-alginate, protoplast culture, plantlet regeneration