

تاثیر زمان نمونه برداری بر القای جنین زائی سوماتیکی از بینه های مادری 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

جنین زائی سوماتیکی یک روش موثر در تکثیر گیاهان در شرایط درون شیشه می باشد. این تحقیق به منظور بررسی اثرات زمان نمونه برداری (تیر، مرداد و شهریور) بر القاء جنین زائی سوماتیکی بینه های مادری زعفران انجام شد. ریز نمونه ها در محیط کشت جامد MS حاوی ۳٪ ساکارز و غلظت های مختلفی از هورمون های BAP و NAA کشت شدند و سپس در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و تاریکی نگهداری شدند. تشکیل کالوس های جنین زا، ۸ هفته پس از کشت مشاهده شد. مقایسه تشکیل کالوس های جنین زا در سه زمان متفاوت نشان داد که سرعت تشکیل جنین ها در یک محیط کشت یکسان، متفاوت است. بیشترین جنین زائی با میانگین ۹۹٪ در بینه های جمع آوری شده مرداد مشاهده شد. بینه های تیر با میانگین ۸۱٪ و بینه های شهریور با میانگین ۳۵٪ به ترتیب در مرتبه دوم و سوم بودند.

واژه های کلیدی: جنین زائی سوماتیکی، زعفران، زمان نمونه برداری

مقدمه

بررسی ها نشان می دهد که تراز هورمون های درون زا با استعداد جنین زائی ریز نمونه ها ارتباط دارد و بنابراین تشکیل کالوس در زمان های مختلف در غلظت های یکسان به یک اندازه القاء نمی شود (مرکل و همکاران، ۱۹۹۵). مطالعات نشان داده است که اکسین ها هورمون هایی هستند که به طور عمده برای القاء جنین زائی استفاده می شوند (کوک و همکاران، ۱۹۹۳). در تک لپه ای هایی همچون زعفران جنین زایی اولیه منحصراً به واسطه محیط های کشت حاوی اکسین القاء می شود (جیمنز و توماس، ۲۰۰۵).

مواد و روش ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق بینه های زعفران مزروعی بودند که از شهرستان شاهرود و در سه زمان متفاوت (هفته آخر تیر ماه، هفته آخر مرداد ماه و هفته آخر شهریور ماه) جمع آوری و برای انجام آزمایشات به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

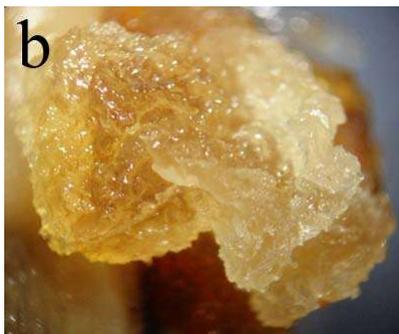
ضد عفونی بینه ها بدین ترتیب بود که ابتدا فلس های موجود روی بینه ها به خوبی برداشته شد و پس از آن بینه ها به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شد. سپس از کلرید جیوه ۰/۱۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۳-۴ مرتبه شستشو با آب مقطر استریل استفاده گردید.

از محیط کشت MS به علاوه ۳٪ ساکارز و غلظت های مختلف هورمونی از دو هورمون BAP و NAA در ۱۶ ترکیب استفاده گردید. اسیدیته محیط قبل از اتوکلاو کردن بین ۵/۸-۵/۷ تنظیم گردید. کشت در اتاقک کشت و در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد و تاریکی حفظ شد.

به منظور القای جنین زائی سوماتیکی کشت ریز نمونه ها در محیط های حاوی غلظت های مختلفی از NAA (0, 0/5)، 1، و 2 میلی گرم در لیتر) در ترکیب با BAP (0, 0/5، 1، و 2 میلی گرم در لیتر) بر اساس طرح بلوک کامل تصادفی با 4 تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شد و عمل واکشت هر ماه صورت گرفت.

نتایج و بحث

تشکیل کالوس های جنین زا، 8 هفته پس از کشت مشاهده شد (شکل a)، در این زمان تشخیص کالوس های جنین زا و غیر جنین زا به خوبی امکان پذیر بود. کالوس های غیر جنین زا با فراوانی بسیار اندک، سفید رنگ تا زرد روشن و با حالتی شیشه ای و پفکی در طول مدت 3 هفته بعد از زمان کشت بر روی ریز نمونه ها پدیدار شدند (شکل b)؛ در صورتیکه کالوس های جنین زا، شیری رنگ و کدر، گره دار و به تعداد فراوان در سطح ریز نمونه قابل مشاهده بودند، این کالوس ها بر خلاف کالوس های غیر جنین زا با گذشت زمان به حالت گویچه ای تبدیل شده و به وضوح در سطح ریز نمونه ها دیده می شدند. میزان تولید جنین در نمونه های شهریور ماه بسیار کمتر از نمونه های مرداد ماه و تیر ماه بود و جنین های تشکیل شده اغلب به آرامی و تنها در برخی قسمت های ریزنمونه مشاهده شد.



نمایی نزدیک از تشکیل کالوس های غیر جنین زا بعد از گذشت 3 هفته

نمایی نزدیک از تشکیل جنین های سوماتیکی بعد از گذشت 8 هفته

بررسی مقایسه میانگین ها نشان می دهد که بیشترین جنین زائی با میانگین 99٪ در بنه های مرداد ماه حاصل شد، و بنه های تیر ماه با میانگین 81٪ و بنه های شهریور ماه با میانگین 35٪ به ترتیب در مقام دوم و سوم قرار گرفتند. از نظر نوع تیمار هورمونی، محیط حاوی یک میلی گرم در لیتر از هر یک از هورمون های BAP و NAA با میانگین 90٪ بالاترین میزان القای جنین زائی را موجب شده است. از نظر اثرات متقابل زمان و نوع تیمار هورمونی مشاهده شد که در مرداد ماه همه تیمارها، به غیر از تیمار شاهد و تیمارهایی که فاقد اکسین بودند جنین زائی را به صورت 100 درصد نشان دادند ولی ماه های تیر و شهریور به ترتیب 90٪ و 38٪ جنین زائی را القاء نموده اند.

در بررسی تعداد جنین های القاء شده در هر ریز نمونه، نتایج حاصل از آنالیز های آماری داده ها نشان داد که اثر زمان نمونه برداری بر تعداد جنین های کروی القاء شده بین نمونه های مرداد ماه و تیر ماه در سطح احتمال 1٪ معنی دار نبوده ولی نمونه های شهریور ماه در سطح احتمال 1٪ معنی دار می باشد. مقایسه میانگین داده ها نشان می دهد که بیشترین تعداد جنین کروی با میانگین 13 جنین در هر نمونه در بنه های مرداد القاء شده است. نمونه های تیر ماه با میانگین 11 و شهریور ماه با میانگین 5 جنین در هر ریز نمونه به ترتیب در رتبه دوم و سوم قرار گرفتند.

نکته دیگر در جنین زایی در کالوس های همه ریز نمونه های زعفران، نگهداری ریز نمونه ها در تاریکی برای القای جنین زائی می باشد. برخی از تحقیقات نشان می دهند که حضور نور باعث ممانعت از رویانزایی و یا کاهش آن می شود. به

همین دلیل ریزنمونه ها در تاریکی مطلق نگهداری شدند و از این طریق جنین زائی به میزان زیادی در آنها القا شد. این نتیجه با نتایج (جورج و همکاران، ۱۹۹۲) و نیز (آهوجا و همکاران، ۱۹۹۴) مطابقت دارد.

References

1. Ahuja A., Kouls R.G., and Koul B.L. ۱۹۹۴. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron. (*Crocus sativus* L.) Ind. J. Exp. Biol., ۳۲(۲):۱۳۵-۱۴۰.
2. Georje P.S., Visvanath, S., Ravishakar g.a., and Venkataraman L.V. ۱۹۹۲. Tissue culture of saffron (*Crocus sativus* L.): Somatic embryogenesis and shoot regeneration. Food Biotechnol. ۶(۳): ۲۱۷-۲۲۳.
3. Cooke, T.J., R.H. Racusen, and J.D. Cohen. ۱۹۹۳. The role of auxin in plant embryogenesis. Plant Cell ۵:۱۴۹۴-۱۴۹۵.
4. Jimenez, V.M., and C. Thomas. ۲۰۰۵. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. Plant Cell Monogr. ۲:۱۰۳-۱۱۸.
5. Merkle, S.A., W.A. Parrott, and B.S. Flinn. ۱۹۹۵. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, TA (ed.), In Vitro Embryogenesis in Plants, pp. ۱۵۵-۲۰۳.

The effect of sampling time on somatic embryogenesis induction from mother corms of Saffron

M. Ahouran¹, R. Hosseini¹, and R. Zarghami²

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

Abstract

Somatic embryogenesis is an efficient method at in vitro propagation of plants. This research was done for studying the influences of sampling time (July, August, and September) on somatic embryogenesis induction of mother corms of saffron. Explants were cultured onto solid MS medium supplemented with ۳% sucrose and different concentration of NAA and BAP, and then maintained at ۲۲°C in darkness. Formation of embryos after 8 weeks of culture was observed. Comparison of explants at three sampling times showed that rate of embryos formation in same medium is different. Most embryogenesis with ۹۹% average showed in corms was collected in August. Corms of July with ۸۱% average and September with ۳۵% average were second and third place respectively.

Key words: somatic embryogenesis, *crocus sativus*, sampling time