رویان زایی سوماتیکی در ریز نمونه برگی صنوبر دلتوئیدس

(*Populus deltoides* Bartr.ex Marshreastern)

علی جعفری مفیدآبادی

عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵

چکیده:

به منظور ارائه شیوه رویان زایی سوماتیکی جهت انجام فرآیندهای دست ورزی ژنتیکی، در مورد صنوبر دلتوئیدس (*Populus deltoides* Bartr.ex Marshreastern) ریز نمونه‌های برگی ایزوله و در محیط کشت MS حاوی هورمونهای رشد 2,4-D و BA به همراه گلوتامین کشت گردیدند. رویانهای سوماتیکی کروی شکل زیادی به طور مستقیم در امتداد رگبرگهای اصلی و فرعی بوجود آمد. بیشترین تعداد رویانهای سوماتیکی کروی شکل (۱۱/۶) در محیط کشت MS حاوی ۲ میلیگرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA همراه ۴۰ میکرومول گلوتامین مشاهده شد. محیط کشت MS حاوی ۵ میلیگرم در لیتر 2,4-D و ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA در تمامی تیمارهای گلوتامین موجب تشکیل کالوس تمایز نیافته زیادی در اطراف ریز نمونه‌ها برگی شد. در محیط کشت باززایی، MS حاوی ۲ میلیگرم در لیتر BA همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر NAA بیشترین در صد باززایی گیاهچه (۷۲/۵٪) در قطعات کالوس به همراه رویانهای سوماتیکی مشاهده شد. گیاهچه‌های حاصل پس از ریشه دار شدن در محیط کشت WPM پایه و انجام موفق سازگاری تدریجی در گلدانهای حاوی خاک با نسبت ۱:۱:۱ پیت، پرلیت و ورمیکولایت، به عرصه منتقل شده‌اند.

کلمات کلیدی: کشت دیسک برگ، صنوبر دلتوئیدس، رویان زایی سوماتیکی

مقدمه

کاربرد روشهای بیوتکنولوژی گیاهی نظیر، کشت پروتوپلاست، انتقال ژن، تنوع سوماکلونی، تنوع گامتوکلونالی، سوسپانسیون سلولی، امتزاج سلولهای سوماتیک، گزینش درون شیشه ای سلولهای جهش یافته و تولید گیاهان هاپلوئید منوط به دستیابی به روش مطمئن باززایی گیاه از سلول و بافت می‌باشد. عدم باززایی سلول و بافتهای گیاهی اغلب به محدودیت بکار گیری روشهای بیوتکنولوژی گیاهی در اصلاح درختان جنگلی منجر می‌گردد. روشهای باززایی در جنس صنوبر تا کنون با موفقیت چشمگیری در مورد کشت پروتوپلاست (Rusell و McCown ۱۹۸۶)، کشت سلول (Cheema ۱۹۸۹)، باززایی جوانه‌های نابجا (Douglas ۱۹۸۴)، انتقال ژن (Fillatti و همکاران ۱۹۸۷)، گزینش درون شیشه‌ای سلولهای سوماتیک جهش یافته[1] توسط Michler و Bauer (۱۹۸۸) گزارش شده است. در میان این جنس، صنوبر دلتوئیدس یکی از گونه‌های صنعتی مهم و با ارزشی از بخش Aigeiros می‌باشد که در سطح نسبتا وسیعی در دنیا مورد کشت و کار قرار می گیرد (Colemen و Ernst ۱۹۸۹) که لازمه اصلاح آن، دستیابی به روش باززایی مطمئن از کشت سلول و بافتهای آن می باشد. باززایی درون شیشه‌ای از این گونه تا کنون در مورد کشت جنین نارس (Koiuder و همکاران ۱۹۸۹)، کشت بساک (Uddin و همکاران ۱۹۹۸، Stoehr و Zsuffa ۱۹۹۰) گزارش شده است. اصلاح درون شیشه ای این گونه به منظور دستیابی به ارقام برتر نیاز به باززایی گیاه در قالب رویان زایی مستقیم[2] و غیر مستقیم[3] دارد. این تحقیق به بررسی امکان باززایی گیاه به روش رویان زایی سوماتیکی از کشت ریز نمونه‌های برگ این گیاه پرداخته است.

1- Mutant
2- Direct somatic embryogenesis
3- Indirect somatic embryogenesis

مواد و روشها :

جهت تهیه بافتهای جوان، قلمه‌های صنوبر دلتوئیدس (*Populus deltoides* Bartr.ex Marshreastern) در گلدان حاوی خاک ۱:۱ پیت و ورمیکولایت ریشه دار شدند. نهالهای حاصل در گلخانه هفته‌ای یکبار با محلول غذایی مایع کود پاشی شدند. به منظور تهیه ریز نمونه، هر ۵ الی ۶ هفته تحریک شاخه زنی جانبی و تشکیل بافتهای جوان با سرزنی نهالها و قطع جوانه انتهایی انجام گرفت. مریستمهای انتهایی و جانبی همراه یک سانتیمتر ساقه پس از ضد عفونی سطحی با محلول ۰/۲ درصد HgCl2 به مدت دو دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل در محیط کشت MS (Murashige و Skoog، ۱۹۶۲) حاوی ۲۰ گرم در لیتر ساکارز، و ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA با pH برابر 5.8 به صورت عمودی کشت شدند. کشتها به اطاق رشد با دمای ۲۶°C و طول روز ۱۶ ساعت با روشنایی ۴۵۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس منتقل شدند. ۵-۴ هفته پس از کشت، برگهای جوان درون شیشه‌ای حاصل از رشد رویشی جوانه‌ها جدا و به تهیه دیسکهای برگی به قطر ۱ سانتیمتر (Leaf disck بوسیله Crok-borer شماره 5) در شرایط استریل اقدام شد. اثرات هورمونهای رشد و گلوتامین بر رویان زایی سوماتیکی با اجرای طرح آزمایشی فاکتوریل در قالب بلوکهای کامل تصادفی با دو تیمار هورمون‌های رشد (ترکیب ۲-۵ میلیگرم در لیتر 2,4-D همراه غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA) و چهار غلظت گلوتامین[1] (۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میکرومول) در چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان ۳۰ گرم در لیتر ساکارز در تمامی محیطهای کشت مورد استفاده بکار گرفته شد. pH محیط کشت در سطح ۵/۸ تنظیم شد. محلول گلوتامین پس از ضد عفونی به وسیله فیلترهای استریل کننده به محلول محیط کشت اتوکلاو شده اضافه گشت. ظروف پتری حاوی محیط کشت استریل شده و نمونه‌های بافتی کشت شده در آن به اطاق رشد با شرایط نوری ۱۶ ساعته

1- L-glotamin

(۵۰۰۰-۴۵۰۰ لوکس) و در دمای ۲۶°C منتقل و نگهداری شدند. به منظور باززایی گیاه از کالوسهای رویانزا و جوانه زنی جنینهای سوماتیکی، قطعات تقریبا هم اندازه و به تعداد مساوی (۵ قطعه) در پتری دیش حاوی محیط کشت MS با ترکیبهای متعدد هورمونهای رشد باززایی گیاه (BA با غلظت ۱ الی ۲ میلیگرم در لیتر همراه NAA با غلظت ۰/۱ الی ۰/۵ میلیگرم در لیتر) انتقال و در شرایط اطاق رشد فوق‌الذکر قرار داده شد.

نتایج و بحث

سه هفته پس از کشت قطعات دایره‌ای شکل برگی (Leaf disk) در محیط کشت MS حاوی ۵ و ۲ میلیگرم در لیتر 2,4-D همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA، رویانهای کروی شکل در امتداد رگبرگهای اصلی و فرعی، و کالوس در اطراف قطعات برگی در محل برش ظاهر شدند (شکل شماره ۱-A). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به اثرات هورمونهای رشد گیاهی، مقدار گلوتامین و اثرات متقابل آنها بر واکنش (تشکیل رویانهای کروی شکل و کالزایی در جداره برگها) ریز نمونه‌ها، بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین ترکیبهای مختلف هورمونی در سطح ۵ درصد و بین غلظتهای متفاوت گلوتامین در سطح یک درصد می‌باشد (جدول شماره ۱). تیمار هورمونی 2,4-D با غلظت ۵ میلیگرم در لیتر همراه BA با غلظت ۰/۱ میلی در لیتر موجب بیشترین (۴۱/۲۵۰ ٪) واکنش ریز نمونه‌ها شد. مقایسه متوسط عملکرد غلظتهای گلوتامین بر میزان واکنش ریز نمونه‌ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن، بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح یک در صد می باشد (جدول شماره ۲). بطور متوسط میزان ۲۰ میکرومول گلوتامین، موجب بیشترین واکنش ریز نمونه‌های برگی (۵۰٪) در ایجاد رویانهای سوماتیکی و کالوسهای رویانزا شد (جدول شماره ۲).

نتایج حاصل از داده‌های جدول شماره ۳ نشان داد که اگرچه گلوتامین در شکل گیری

و تشکیل رویانهای سوماتیکی موثر نبود لیکن افزایش غلظت آن موجب افزایش در فراوانی رویانهای سوماتیکی تا میزان ۴۰ میکرومول در محیط کشت MS حاوی ۲ میلیگرم در لیتر 2,4-D همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA شده است. مقایسه اثرات متوسط هورمونهای رشد بکار گرفته بر روی تعداد رویانهای سوماتیکی و در صد کال زایی، نشان می دهد که بیشترین تعداد رویانهای سوماتیکی (۱۱/۶) در ترکیب هورمونی 2,4-D با غلظت ۲ میلیگرم در لیتر و ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA همراه ۴۰ میکرو مول گلوتامین بدست آمده است. بیشترین کالوسهای تمایز نیافته نیز در ترکیب هورمونی ۵ میلیگرم در لیتر 2,4-D همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر BA تقریبا در تمامی غلظتهای گلوتامین در جداره ریز نمونه برگی در محلهای برش داده شده پدیدار شد که بیانگر عدم تاثیر و یا تاثیر ضعیف گلوتامین بر میزان کال زایی ریز نمونه‌ها می باشد (جدول شماره ۳). هورمون 2,4-D جهت ایجاد کال و بررسی روش‌های باززایی از بافت‌های مختلف صنوبر بکار گرفته شده است (Michler و Baller ۱۹۸۸). برای تولید کالوسها و تشکیل مستقیم رویان بر ریز نمونه برگی، توسعه فیزیولوژیکی ریز نمونه (برگ) از اهمیت زیادی بر خوردار بود، به طوری که بیشترین واکنش ریز نمونه‌های برگی در ریز نمونه‌های تهیه شده از برگهای نیمه متکامل، مشاهده شد. در آزمایش حاضر، گلوتامین[1] موجب تحریک در ایجاد رویانهای سوماتیکی شد که با گزارش Michler و Baller (۱۹۸۸) همسویی دارد. به نظر می رسد که تشکیل کالوسها و رویانهای سوماتیکی کروی شکل بیشتر تحت تاثیر غلظت هورمون رشد 2,4-D می باشد چرا که افزایش غلظت از ۲ میلیگرم در لیتر به ۵ میلیگرم در لیتر این هورمون موجب تشدید تکثیر سلولی و افزایش میزان کالزایی با کاهش رویانهای سوماتیکی ایجاد شده در امتداد رگبرگهای اصلی و فرعی شده است.

سه هفته پس از کشت قطعات برگی حاوی رویانهای سوماتیکی و کالوسهای تمایز

1- L-glutamine

نیافته بر روی محیط کشت باززایی، رویان‌ها در مرحله سرنیزه‌ای در سطح کالوس ظاهر شد که در باز کشت‌های بعدی در محیط مشابه گیاهچه‌ها پدیدار شدند (شکل شماره ۱-B و شکل شماره ۲-A). ظهور مرحله کروی و سرنیزه‌ای رویانهای سوماتیکی، بیانگر باززایی گیاهچه از طریق رویان زایی سوماتیکی در محیط کشت باززایی می باشد. مقایسه میانگین عملکرد تیمارهای هورمونی بر روی باززایی گیاه بر اساس آزمون T بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین آنها می باشد (جدول شماره ۴). بیشترین درصد باززایی گیاه (۷۲/۵٪) و بیشترین تعداد گیاه بر روی قطعات کالوس در محیط کشت MS حاوی ۲ میلیگرم در لیتر BA همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر NAA حاصل شد (جدول ۴). باززایی به شیوه اندام زایی[1] در کشت میان گره‌های ساقه، در صنوبر دلتوئیدس توسط Colemen و Ernst (۱۹۸۹) گزارش شد. باززایی گیاه به صورت انبوه از کالوسهای حاصل از کشت ریز نمونه برگ در قالب روش اندام زایی در دو گونه مختلف صنوبر توسط Colemen و Ernst (۱۹۹۰) انجام شد. شیوه‌های متفاوت باززایی گزارش شده در گونه‌های مختلف صنوبر،بیانگر وابستگی شیوه‌های باززایی به گونه و ژنوتیپهای مورد مطالعه میباشد.

گیاهچه‌ها پس از ریشه دار شدن در محیط کشت به WPM پایه، جهت انجام مرحله سازگاری تدریجی به گلدانهای حاوی خاک به نسبت ۱:۱:۱ پیت، پرلیت و ورمیکولیت انتقال یافتند (شکل شماره ۲-B).

1- Organogenesis

جدول شماره ۱: تجزیه واریانس داده‌های مربوط به واکنش جدا کشتها در برابر هورمونهای رشد گلوتامین.

منبع تغییرات	Df	SS	MS	F
تکرار	۳	۱۴۵۰	۳۳/۴۸۳	-
A	۱	۲۱۱۲/۲۵۰	۵۰۰/۲۱۱۲	۷/۵۲*
B	۳	۶۵۰۰	۶۶۷/۲۱۶۶	۷/۷۱ **
A*B	۳	۱۰۳۷/۵	۸۳۳/۳۴۵	-
خطا	۲۱	۵۹۰۰	۲۸۰/۹۵۲	-
کل	۳۱	۱۷۰۰۰	-	-

* = اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد

** = اختلاف معنی دار در سطح یک در صد

جدول شماره ۲: مقایسه درصد متوسط رویان زایی سوماتیکی و کالوسهای تمایز نیافته به منظور ارزیابی واکنش ریز نمونه‌های برگی به غلظتهای مختلف گلوتامین با استفاده از آزمون دانکن.

غلظت گلوتامین در محیط کشت (میکرومول)	درصد رویانزایی سوماتیکی و ایجاد کالوسهای رویانزا
۰	۱۵b
۲۰	۵۰a
۴۰	۴۲a
۸۰	۲۲/۵ab

جدول شماره ۳: اثرات متوسط گلوتامین و هورمونهای رشد بر تعداد رویانهای سوماتیکی و در صد کال زایی در ریز نمونه‌های برگ.

ترکیب هورمونهای رشد در محیط کشت MS	غلظت گلوتامین (میکرومول)	واکنش ریز نمونه ها در محیط کشت حاوی هورمون های رشد و گلوتامین	
		متوسط تعداد رویا نهای سوماتیکی	وضعیت کال زایی
2 mg/l 2,4-D 0.1 mg/l BA	۰	۱/۷	++
	۲۰	۱/۴	+
	۴۰	۱۱/۶	++
	۸۰	۹/۴	++
5mg/l 2,4-D 0.1 mg/l BA	۰	۱/۱	+++
	۲۰	۷/۳	++
	۴۰	۱/۲	+++
	۸۰	۱/۹	+++

+ = هر علامت تقریبا بیانگر ۲۵ درصد کال زایی (مشاهده‌ای) را شامل می‌گردد.

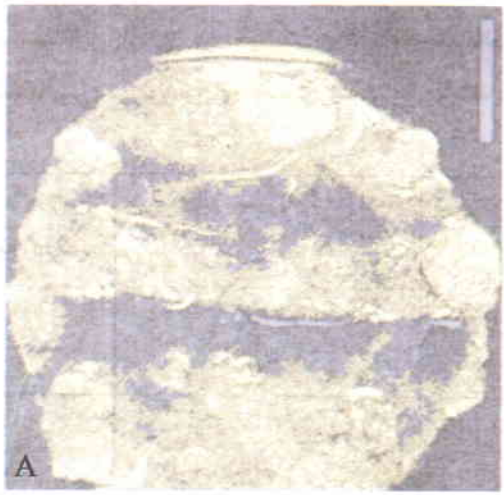
جدول شماره ۴: مقایسه میانگین باززایی در محیط کشت MS (درصد کالوسهای به شاخه رفته و تعداد شاخه در هر قطعه کالوس) در هورمونهای نختلف رشد گیاهی با استفاده از آزمون T.

ترکیب هورمونهای رشد گیاهی		درصد کالوسهای به گیاه رفته	متوسط تعداد گیاهچه باززایی شده بر روی هر قطعه کالوس
NAA Mg/l	BA Mg/l		
۱	۲	۷۲/۵*	۶/۵*
۰/۵	۱	۴۲/۵	۱/۷۵
۱	۲	۷۲/۵*	۶/۵*
۰/۱	۲	۳۷/۵	۲/۶*
۱	۲	۷۲/۵*	۶/۵*
۰/۱	۱	۳۲/۵	۲/۱۲۵
۰/۵	۱	۴۲/۵ns	۱/۷۵ ns
۰/۱	۲	۳۷/۵	۲/۶
۰/۵	۱	۴۲/۵ ns	۱/۷۵ ns
۰/۱	۱	۳۲/۵	۲/۱۲۵
۰/۱	۲	۳۷/۵ ns	۳/۶ ns
۰/۱	۱	۳۲/۵	۲/۱۲۵

* = اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد

** = اختلاف معنی دار در سطح یک در صد

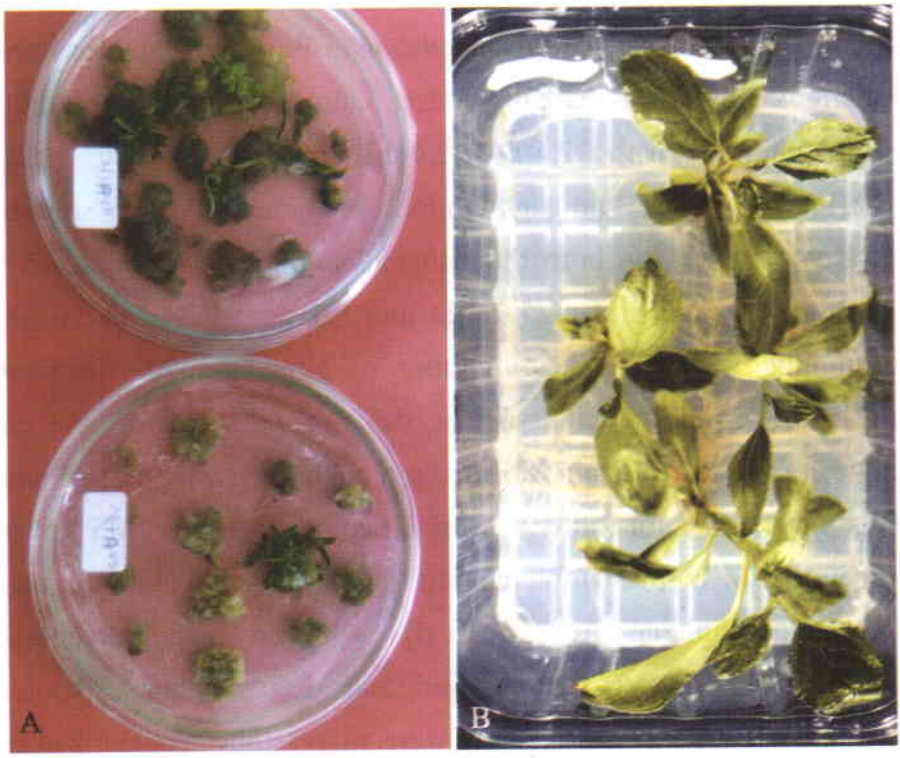
ns = عدم وجود اختلاف معنی دار



شکل شماره ۱:

A- ظهور رویانهای سوماتیکی کروی شکل در امتداد رگبرگهای اصلی و فرعی و کالوسهای تمایز نیافته در حاشیه ریز نمونه.

B- جوانه زنی رویانهای سوماتیکی در محیط کشت باززایی.



شکل شماره ۲:

A- ظهور گیاهچه‌ها روی ریز نمونه‌های برگی ۴ هفته پس از کشت در محیط باززایی

B- ریشه زایی گیاهچه‌ها در محیط ریشه زایی

Somatic embryogenesis in leaf culture of *Populus deltoides* Bartr.ex Marshreastern

Ali Jafari-Mofidabadi[1]

Abstract

In order to develope somatic embryogenesis for genetic manipulation process of *Populus deltoides* Bartr.ex Marshreastern, isolated leaf disk explants were cultured on MS medium supplemanted with 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), BA(benzyladenine) and glutamine. High number of somatic embryos formed on both the midveins and secondary veins. MS medium containing 2 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA with 20 μM glutamine showed highest number of globular-shaped embryo (11.6). Most of the embryogenic calli were formed on the cut edges of the leaf disks in MS medium containing 5 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BA for all glutamine concentrations. MS plant regeneration media supplemented with 2 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA (Naphtalene Accetic Acid) produced high percentage (72.5%) of plantlets on callused leaf disks explants. Rooted plantlets in WPM basal medium were successfully acclimatized on soil medium (1:1:1 peat, perlit and vermiculite) and transfered to the field.

Key words: Leaf disk culture, *Populus deltoides*, Somatic embryogenesis, Emryognic calli.

1- Department of Genetics and Plant Physiology, Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran

منابع

Cheema, G.S., 1989. Somatic embryogenesis and plant rgeneration for call suspension and tissue culture of mature himalayan populus (*P. celliatia*). Plant Cell Rep., 8: 124-127

Colement, G.D. and S.G. Ernts, 1989. *In vitro* shoot regeneration of *Populus deltoides* :effect of cytokinin and genotype. Plant Call Reports, 8:459-462

Douglas, G.C., 1984. Formation of adventitive bud in stem internod of *Populus spp*. cultured *in vitro* on basal medium . influence of endogenous properties of explant. J. Plant Physiologe, 116:311-321

Fillatti, J. J., J. Sellmer, B. McCown, B. Haissig, I. Comai, 1987. Agrobacterium mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet., 206:192-199

Michler, C. H. and E. O. Baller, 1988. Somatic embryogenesis in plant cell cultures of *Populus*. *In Vitro* Cell Dev. Biol., 23: 121-126

Russell, J. A. and B. H. McCown, 1986. Culture and regeneration of *Populas* leaf protoplasts isolated from non- seedling tissue. Plant Sc., 46: 133-142

Stoehr, M. U. and I. Zsuffa, 1990. Induction of hapliods *Populas mayimowiczil* via embryogenic callus. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 23: 49-58

Uddin, R. M., M. M. Meyer, and J. J. Jakela, 1998. Plantlet production of Eastern cottonwood (*Populus deltoides*). Can. J. For. Res., 13: 1837-941

Kouider, M., R. Skirvin, R. and K. P. Saladin, 1988. A method to culture immature embryo of *Populus deltoides*. *In vitro* Can. J. For Res., 14: 956-958.