نوپدیدی گیاه کلزا در درون شیشه و ساقه‌زایی غیرمستقیم از آن در کشت محور زیرلپه

احمد مجد، فیروزه چمن دوستی،صدیقه مهرابیان: دانشگاه تربیت معلم تهران

چکیده

هدف این پژوهش دست‌یابی به شرایط بهینه در ریز ازدیادی کلزا براسیکا نپوس[۱]، القای کالوس‌زایی و تولید گیاهچه‌ها با روش کشت در شیشه بوده است. جداکشت‌های محور زیر لپه‌ای رقم طلایه این گیاه در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ(MS) به همراه انواع و غلظت‌های متفاوتی از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی نظیر ۲، ٤- دی کلروفنوکسی اسید(2,4-D)، بنزیل آدنین(BA) و اندول بوتیریک اسید(IBA) در ظرف‌های پتری کشت شدند. نتایج آزمایش‌های زیاد و تکرار آن‌ها نشان داد که: در محیط کشت پایه MS دارای۲ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آدنین و نیز در همین محیط کشت دارای ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA همراه با ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کالوس‌های سفید رنگی ایجاد می شدند که وقتی قطر آن‌ها به ۵ تا ٦ میلی‌متر می‌رسید اندام‌های هوایی تشکیل می‌دادند. با حذف BA از محیط کشت و انتقال نو ساقه‌ها به محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیترIBA ریشه‌ها تولید شدند و گیاهچه‌های کاملی را به وجود آوردند. در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA وغلظت‌های متفاوتی از2,4-D کالوس‌های زرد رنگی به وجود آمدند که ویژگی‌های کالوس‌های رویان‌زا را داشته و بررسی‌های میکروسکوپی در برش‌های طولی و عرضی آن‌ها وجود ساختارهای ابتدایی رویانی را در آن‌ها به اثبات رسانید. در محیط‌های کشت پایه MS با بیش از ۲ میلی‌گرم در لیترIBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کالوس‌های قهوه‌ای رنگی پدیدار شدند که رشد بسیار کمی داشته و در نهایت از بین رفتند.

مقدمه

گونه‌های زراعی جنس براسیکا منابع بسیار مهمی از مواد غذایی(با داشتن ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها و جوانه‌های خوراکی) و نیز منبع سرشاری از روغن‌های گیاهی(دانه‌های روغنی) به شمار می‌روند. براسیکا نپوس یکی از سه گونه مهم سرده براسیکا است که به عنوان گیاه روغنی ارزش زیادی دارد و در ایران به مقدار زیاد کشت می‌شود. تراریختی وراثتی گیاهان و نیز کلون‌سازی ژن‌ها از ابزارهای مهم برای اصلاح گیاهان زراعی هستند. توسعه و ارائه روش‌های مناسب و سهل‌الوصول کشت یاخته‌ها، بافت‌ها و اندام‌های گیاهی اولین گام در استفاده از این ابزار مهم و قدرتمند اصلاح گیاهان محسوب می‌شود[۲],[٤],[٥],[۸].

واژه‌های کلیدی: کلزا، کالوس، مواد تنظیم کننده رشد گیاهی

۱-Brassica napus L.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]

گزارشات متعدد و متنوعی مبنی بر نوپدیدی گیاهان‌هاپلویید با استفاده ازکشت میکروسپورهای تک یاخته‌ای این گیاه و ایجاد رویان‌های‌هاپلویید از آن‌ها و تبدیل رویان‌ها به گیاهچه‌ها موجود است. این روش‌ها طی سالیان اخیر بهینه‌سازی شده‌اند[۱۹] و رویان‌های بدنی از بخش‌هایی از گیاه حاصل می‌شوند که بالقوه دارای خاصیت زایش هستند[۱۵]. استفاده از تنوع سوماکلونی در تولید گیاهان جدید موفق بوده است اما کاربرد آن برای تولید لاین‌های اصلاح شده جدید در دانه‌های روغنی خانواده شب‌بو هنوز گزارش نشده است. با توجه به نیاز مبرم کشور در زمینه تامین روغن و پروتئین گیاهی از راه توسعه کشت گیاهان روغنی از جمله کلزا، کسب آگاهی‌های علمی‌در مورد این گیاه و بهینه‌سازی ریزازدیادی آن می‌تواند مفید و گامی در جهت رفع نیاز کشور باشد.

مواد و روش‌ها

جوانه‌زنی بذر و تهیه جداکشت

بذور گیاه کلزای رقم طلایه پس از تهیه از مرکز توسعه و کشت و صنعت دانه‌های روغنی و انتقال به آزمایشگاه در شرایط استریل زیر هود(L.A.F) و با استفاده از هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس با ٥ درصد کلر فعال) به مدت ٨ دقیقه ضد عفونی شدند، و پس از ٤ بار شست وشو با آب مقطر استریل در محیط‌های کشت پایه MS در ارلن‌های ٢٥٠ میلی‌لیتری که هر کدام دارای ٥٠ میلی‌لیتر از این محیط بودند، کشت شدند. ارلن‌ها در شرایط نور دوره‌ای ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی و میزان نور تقریباً ٢٠٠ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگه‌داری شدند. پس از گذشت ١٤ روز، محور زیر لپه دانه‌رست‌های سترون حاصل به قطعات ٥ تا ٦ میلی‌متری تقسیم و به عنوان جداکشت استفاده شدند.

محیط‌ها و شرایط کشت

محیط‌های کشت پایه در این آزمایش‌ها عبارت از محیط کشت پایه MS(نمک‌ها و ویتامین‌ها) MS ٠/٥(نمک‌ها و ویتامین‌ها) و محیط کشت B5 گامبرگ[1] و همکارانش(١٩٧٦)(نمک‌ها و ویتامین‌ها) بودند که به همه آن‌ها ٣٠ گرم درلیتر ساکارز، ١٠ گرم در لیتر آگار اضافه شد. به این محیط‌های کشت غلظت‌های متفاوتی از اکسین‌ها(2, 4- D و IBA) و سیتوکینین(BA) اضافه شد. همچنین از محیط‌های کشت پایه بدون مواد تنظیم کننده رشد گیاهی نیز به عنوان شاهد استفاده شد. pH محیط‌های کشت قبل از اوتوکلاو با استفاده از سود یک نرمال(NaOH 1N) و اسید یک نرمال(HCl 1N) در حد ٥/٨ تنظیم شد. تمام کشت‌ها در دمای ٢±٢٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. کشت‌ها در مرحله کالوس‌زایی درتاریکی و در مرحله اندام‌زایی تحت نور با شدت ٢٠٠ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه نگه‌داری شدند.

١-Gamborg

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]

القای کالوس

قطعات ۵ تا ۶ میلی‌متری محور زیر لپه بر روی محیط‌های کشت پایه MS, 0.5MS و B5 همراه با ۲ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA کشت شدند. از محیط‌های دارای ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و نیز ۲ میلی‌گرم در لیتر BA نیزبه تنهایی استفاده شد. همه محیط‌های کشت دارای ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیدرولیزای کازئین نیز بودند. بعد از گذشت حدود ۲۰ روز وجود یا نبود کالوس و کیفیت آن بر مبنای رنگ و قدرت نوپدیدی یا شبه رویان زایی بررسی شد.

تشکیل ساقه و نوپدیدی گیاه

کالوس‌های سفید رنگ در حال تکثیر سلولی و افزایش حجم بعد از حدود یک ماه بر روی محیط‌های کشت پایه MS دارای ترکیبات هورمونی قبلی(محیط‌های القای کالوس) به منظور ساقه‌زایی واکشت شدند. ساقه‌ها برای ریشه‌زایی به محیط‌های کشت پایه MS بدون هورمون و نیز محیط MS همراه با ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید(NAA) و ۱ تا ۲ میلی‌گرم درلیتر IBA منتقل شدند. درصد ساقه‌های ریشه‌دار شده ۲۰ روز بعد ازکشت محاسبه شد.

بررسی‌های میکروسکوپی

کالوس‌ها در فیکساتور FAA(ترکیبی از۱۷ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه، ۲ میلی‌لیتر فرمالدئید ۳۷ درصد و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسایل) تثبیت شدند. از مراحل آب‌گیری و اشباع‌سازی با پارافین، عبور کردند. پس از قالب‌گیری برش‌هایی با ضخامت ۸ میکرومتر با میکروتوم دستی چرخنده از آن‌ها تهیه شد. سپس لام‌ها از مراحل پارافین زدایی, آب‌دهی مجدد و رنگ‌آمیزی سریع عبور داده شدند. در خاتمه با رنگ‌آمیزی مضاعف هماتوکسیلین و ائوزین رنگ شدند[۱۲].

بررسی‌های آماری

همه آزمایش‌ها بر پایه طراحی تصادفی تنظیم و سه مرتبه تکرار شدند. هر تیمار شامل ۲۰ تکرار بود. مشاهدات بر مبنای تعداد جداکشت‌های تشکیل‌دهنده ساقه تنظیم شد و داده‌ها تحت آزمون دانکن(تست آنوآ[۱]) قرار گرفتند.

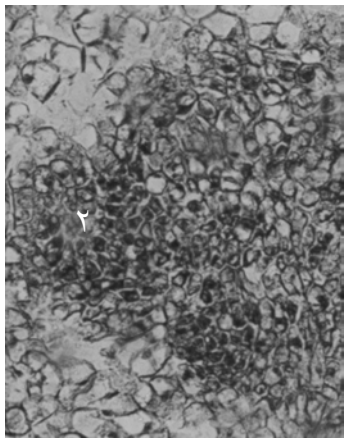
۱-anova

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]

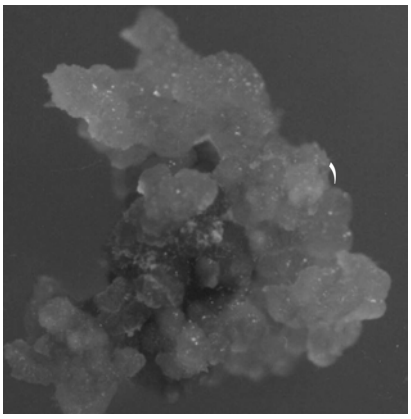
نتایج

القای کالوس

بعد از گذشت حدود ۲ هفته از استقرار جداکشت‌ها(محورهای زیر لپه) در محیط کشت، کالوس‌ها در دو انتهای جداکشت‌ها تشکیل شدند. ۲۰ روز بعد ازکشت، این کالوس‌ها از لحاظ رنگ ظاهری و قدرت نوپدیدی به سه نوع متفاوت قابل تقسیم بودند. کالوس‌های سفید رنگ در محیط‌های دارای ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و نیز ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به تنهایی تشکیل می‌شدند. کالوس‌های زرد رنگ در محیط‌های کشت دارای غلظت‌های متفاوتی از 2,4-D با ۲ میلی‌گرم در لیتر BA به وجود آمدند. بررسی‌های میکروسکوپی نوری حضور ساختارهای ابتدایی رویانی را درمراحل ابتدایی شکل‌گیری در محیط دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA نشان داد(شکل‌های ۱ و۲). در محیط‌های کشت با بیش از۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و۱ میلی‌گرم در لیتر BA کالوس‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره بودند و به تدریج از بین رفتند.



شکل۱- کالوس ایجاد شده از جداکشت‌های محور زیر لپه در محیط MS دارای ۱۰ میلی گرم در لیترD-2,4 و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA



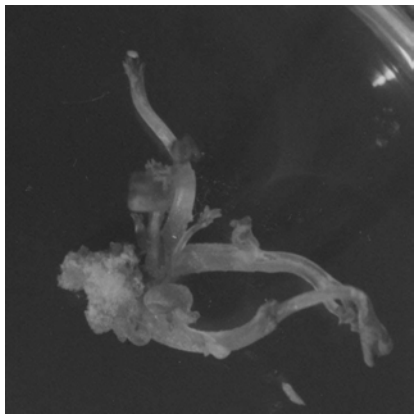
شکل۲- برش میکروسکوپی مربوط به شکل ۱ که یکی از رویان‌ها را درمرحله قلبی شکل نشا ن می‌دهد

تشکیل ساقه

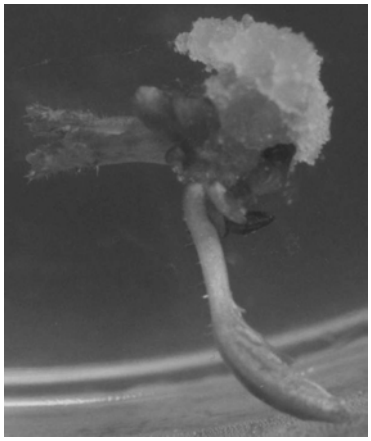
همان طور که قبلاً نیز اشاره شد سه نوع کالوس بر اساس رنگ و توان نوپدیدی در محیط‌های کشت تشکیل شدند. تأثیر نوع کالوس‌ها(سفید و زرد) و محیط‌های کشت بر روی واکنش‌های ریخت‌زایی کاملا مشخص و آشکار بود. کالوس‌های سفید رنگی که در محیط‌های کشت پایه همراه با ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیترBA و نیز۲ میلی‌گرم در لیترBA تشکیل شدند به مقدار خیلی زیادی ساقه‌زایی کردند (شکل‌های ۳ و ٤) در طی دومین واکشت بر سطح این کالوس‌ها توده‌های روشن و کوچکی پدیدار شدند که با

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]

تکثیر و نمو بیش‌تر به ساقه تبدیل شدند. میانگین تعداد ساقه‌ها در هر جداکشت درمحیط دارای ۲ میلی گرم در لیتر BA بیش‌ترین مقدار بود.(۰/۲۷ ± ۸۹ درصد).



شکل۳- ساقه ایجاد شده در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA



شکل٤- ساقه‌های ایجاد شده در محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA

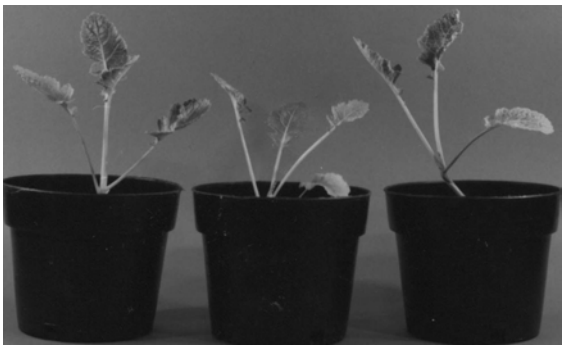
ریشه‌زایی و نوپدیدی گیاه

ساقه‌های نو پدید به محیط‌های کشت MS دارای NAA و IBA و نیز محیط پایه بدون هورمون برای ریشه‌زایی واکشت شدند. فقط در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیترIBA ریشه‌زایی مشاهده شد. در این محیط کشت طی حدود ۲ روز(کم‌تر از سایر محیط‌ها) ریشه‌های نوپدید با بیش‌ترین مقدار(۹۰ درصد) تشکیل شدند. دو هفته بعد از انتقال ساقه‌ها به این محیط هر کدام ۸ تا ۹ ریشه ایجاد کردند و به این ترتیب گیاهچه‌های کامل به وجود آمدند. گیاهچه‌های کامل مراحل سازش با محیط کم رطوبت بیرون از شیشه را طی کرده و سپس گلدانی شدند(شکل‌های ٥ و ٦ و ٧).

شکل ٥- ریشه‌زایی در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به تنهایی و تشکیل گیاهچه‌های کامل

شکل ٦- گیاهچه‌های شکل ٥ در مرحله سازش

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]



شکل ۷- گیاهچه‌های شکل ٦ در مرحله گلدانی شدن

بحث

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که حضور 2,4-D در محیط‌های کشت سبب ایجاد کالوس‌های زرد رنگ می‌شود. گزارش‌های فراوانی بر پایه مشاهدات مسکروسکوپی و توان نو پدیدی وجود دارند که نشان از رویان زا بودن این نوع از کالوس‌ها دارند[۲]،[٤]،[٥]،[٨]،[٩]،[١٠]،[١١]،[١٤]. رویان‌زایی پیکری شامل مراحل متعددی است که اولین مرحله آن چنین است:

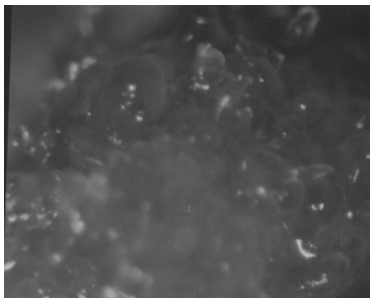
آغاز کشت‌های رویان زا، با کشت جداکشت‌های اولیه بر روی محیط‌های کشت تکمیل شده با مواد تنظیم کننده رشد گیاهی مخصوصاً اکسین‌ها و در برخی موارد سیتوکینین‌ها[١٥]. در آزمایش‌های ما نیز کالوس‌های زرد رنگ هیچگونه نشان ویژگی‌های ریخت‌زایی حتی پس از ٥ ماه استقرار در محیط کشت نشان ندادند(ساقه‌ها و ریشه‌های نوپدید ایجاد نکردند). ولی بررسی‌های میکروسکوپی حضور ساختارهای رویانی را در آن‌ها به اثبا ت رسانید. کالوس‌های ایجاد شده در محیط‌های کشت پایه دارای ۱ تا ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA ساقه‌های نو پدید ایجاد کردند. میانگین ایجاد ساقه‌های نو پدید در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیترBA از سایر محیطها بیش‌تر بود. Y. H. DAN و همکاران در سال ۱۹۹۸ اعلام داشتند که محورهای زیر لپه دانه‌رست‌های ۷ روزه گیاه سویا بعد از قرار گرفتن در محیط‌های کشت دارای ٥ تا ۱۰ میکرو مولار بنزیل آدنین(BA) ساقه‌های نوپدید ایجاد کردند. همچنین رودراسمی[۱] و همکارانشان درسال ۱۹۹۸ ثابت کردند که تعداد ساقه‌های نوپدید ایجاد شده در محیط‌های کشت بافت برنج بستگی مستقیمی با مقدار این هورمون در محیط کشت دارد.

بر سطح کالوس‌های سفید رنگ ایجاد شده در محیط کشت دارای۲ میلی‌گرم در لیتر BA برجستگی‌های انگشت مانندی ظاهر می‌شدند که با بررسی‌های اولیه کاملا شبیه رویان‌های پیکری بودند(شکل۸). برش‌های میکروسکوپی تهیه شده از این برجستگی‌ها وجود مریستم‌های رویشی را در آن‌ها ثابت کرد. بنا بر این می‌توان

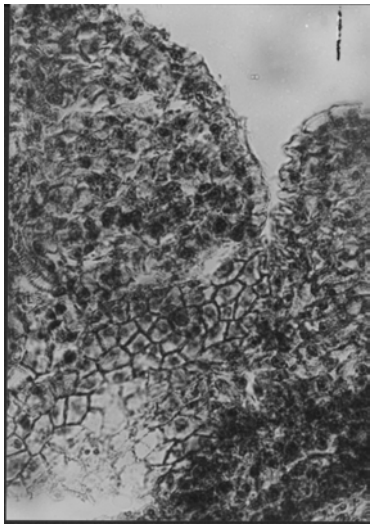
۱-V. Rudraswamy

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]

نتیجه گرفت که مراحل ایجاد مریستم‌های رویشی و ساقه‌های نوپدید به شکل کامل و یا بخشی از این مراحل در محیط‌های کشت حالاتی شبیه به رویان‌زایی پیکری را طی می‌کنند(شکل ۹). این نتایج با گزارش‌های جی.پی لیو[۱] و همکارانش هم‌سویی دارد.



شکل ۸- برجستگی‌ها انگشت مانند ایجاد شده بر سطح کالوس‌های سفید به وجود آمده در محیط دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA



شکل۹- برش میکروسکوپی از یکی ازاین برجستگی‌ها

جدول ۱- واکنش ساقه‌زایی جداکشت‌های محور زیر لپه در محیط‌های کشت MS دارای مقادیر متفاوتی از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی

واکنش ساقه زایی بر حسب تعداد ساقه‌های ایجادشده در هر جداکشت	۲،٤-دی کلروفنوکسی استیک اسید	بنزیل‌آدنین	ایندول بوتیریک اسید
0^{e}	0	1	0.7
0.56 ± 0.16^{b}	0	1	1
0.58 ± 0.019^{e}	0	1	2
0^{e}	0	1	3
0^{e}	0	1	5
0^{e}	2	1	0
0^{e}	3	3	0
0^{e}	4	4	0
0^{e}	5	5	0
0^{e}	6	6	0
0^{e}	7	7	0
0^{e}	8	8	0
0^{e}	9	9	0
0^{e}	10	10	0
0.89 ± 0.27^{a}	0	0	0

۱-J. P. Luo

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]

هر آزمایش سه مرتبه تکرار شده و درمجموع برای هر تیمار ۲۰ تکرار استفاده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود بین تیمارهای ۲، ۳ و ۱۵(که واکنش ساقه‌زایی در آن‌ها مشاهده شد) اختلاف معنی‌دار درسطح ۱ درصد خطا مشاهده می‌شود.

منابع

۱- عزیزی، مهدی؛ سلطانی، افشین؛ خاوری خراسانی، سعید؛ کلزا فیزیولوژی، زراعت، به‌نژادی و تکنولوژی زیستی, ترجمه, انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد(۱۳۷۸).

2. A.Kebebew, M.D.Gaj, M.Maluszynski, Plant Cell Rep,Vol.18(1998) 154-148.

3. Ben.A, Bergmann, Heung-Kyu Moon, Plant cell Rep,Vol. 16(1997) 315-319.

4. Bot.Bull, Acad. Sin,Botanical Bulletin of Academia Sinica,Vol. 42(2001) 9-16.

5. C.K. Salunkhe, P.S.Rao, Minal Mhatre, Plant Cell Rep,Vol. 18(1999) 670-673.

6. Hui Tian, Cheng Yi Yao and Meng Xiang Sun, Plant Cell Tissue Organ Culture, Vol. 79(2004) 159-165.

7. Jian-Ping Luo, Shao-Tong Jiang, Li-Jun Pan, Plant Sci,Vol. 161(2001) 125-132.

8. J.P.Luo,J.F.Jia, Plant Cell Rep,Vol. 17(1998) 567-570.

9. K.H.Neumann, Based on a lecture at the 87th Indian Science congress Jan.In Pune, India(۲۰۰).

10. Kyungsoon Lee, Hyesung Jeon, Minkyun Kim, Plant Cell Tissue Organ Culture,Vol. 71(2002)137-244.

11. M.Selles, F.Viladomat, J. Bastida C Codina, Plant Cell Rep,Vol. 18(1999) 646-651.

12..Martoja R(Facu lte des Sciences de Paris) et M.Martoja – Pierson(CN R S), V °(1967) 73.

13. P.Vencatachalam, N.Geetha, Abha. Khandelwal, M.S.Shaila, and G.Lakshmi Sita, Department of Microbiology and Cell Biology (1999.)

14. R.Raj Bhansali, J Driver and D J Durzan, Journal of Horticultural Science, Vol.(1999) 601-605.

15. Sara von Arnold, Isabela Sabala, Peter Bozhkov, Julia Dyachok, Lada Filonova, Plant Cell Tissue Organ Culture, Vol. 69(2002) 233-249.

16. V Rudraswamy, N A Reichert, In vitro Cell. Dev. Biol-Animal,Vol. 34(1998) 3 part II.

17. Y H.Dan, L. L Mcdougald, J.M.Tyler, and N A Reichert, In vitro Cell. Dev. Biol-Animal, vol. 34(1998) 3 part II.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2025-01-05]