

## نوپیدی 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 نیپوس<sup>۱</sup>، 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 اسکوک (MS) به همراه انواع و غلظت‌های متفاوتی از مواد تنظیم کننده رشد گیاهی نظیر ۲، ۴-دی کلروفونکسی 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 دارای ۲ 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 می‌شدند که وقتی قطر آن‌ها به ۵ تا ۶ میلی‌متر می‌رسید اندام‌های هوایی تشکیل می‌دادند. با حذف BA از محیط کشت و انتقال نو ساقه‌ها به محیط دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌ها تولید شدند و گیاهچه‌های کاملی را به وجود آوردند. در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و غلظت‌های متفاوتی از 2,4-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 لیتر IBA 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 نیپوس 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]، [۴]، [۵]، [۸].

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

<sup>۱</sup>-Brassica napus L.

گزارشات متعدد و متنوعی مبنی بر نوپیدی گیاهان هاپلوئید با استفاده از کشت میکروسپورهای تک یاخته‌ای این گیاه و ایجاد رویان‌های هاپلوئید 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 علمی در 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 ۵ درصد کلر فعال) به مدت ۸ دقیقه ضد عفونی شدند، و پس از ۴ بار شست و شو با آب مقطر استریل در محیط‌های کشت پایه MS در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که هر کدام دارای ۵۰ میلی‌لیتر از این محیط بودند، کشت شدند. ارلن‌ها در شرایط نور دوره‌ای ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و میزان نور تقریباً ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۴ روز، محور زیر لپه دانه‌رست‌های سترون حاصل به قطعات ۵ تا ۶ 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/۰/۵ (نمک‌ها و ویتامین‌ها) و محیط کشت B5 گامبرگ<sup>۱</sup> و همکارانش (۱۹۷۶) (نمک‌ها و ویتامین‌ها) بودند که به همه آن‌ها ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱۰ گرم در لیتر آگار اضافه شد. به این محیط‌های کشت غلظت‌های متفاوتی از اکسین‌ها (IBA و 2, 4-D) 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 اتوکلاو با استفاده از سود یک نرمال (NaOH 1N) و اسید یک نرمال (HCl 1N) در حد ۵/۸ تنظیم شد. تمام کشت‌ها در دمای ۲۴±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کشت‌ها در مرحله کالوس‌زایی در تاریکی و در مرحله اندام‌زایی تحت نور با شدت ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند.

<sup>۱</sup>-Gamborg

### 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 نیز به 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 نوپیدی یا شبه رویان زایی بررسی شد.

### تشکیل ساقه و نوپیدی 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 و اکشت 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 در لیتر IBA منتقل شدند. درصد ساقه‌های ریشه‌دار شده ۲۰ روز بعد از کشت محاسبه شد.

### بررسی‌های میکروسکوپی

کالوس‌ها در فیکساتور FAA (ترکیبی از ۱۷ 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

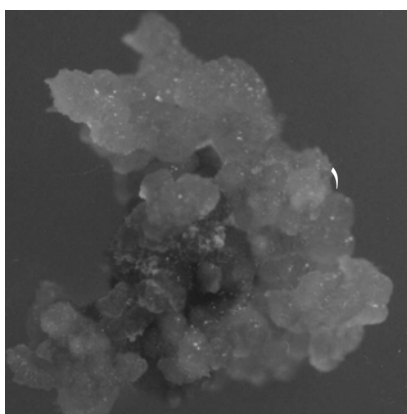
همه آزمایش‌ها بر پایه طراحی تصادفی تنظیم و سه مرتبه تکرار شدند. هر تیمار شامل ۲۰ تکرار بود. مشاهدات بر مبنای تعداد جداکشت‌های تشکیل‌دهنده ساقه تنظیم شد و داده‌ها تحت آزمون دانکن (تست آنوا<sup>۱</sup>) قرار گرفتند.

<sup>۱</sup>-anova

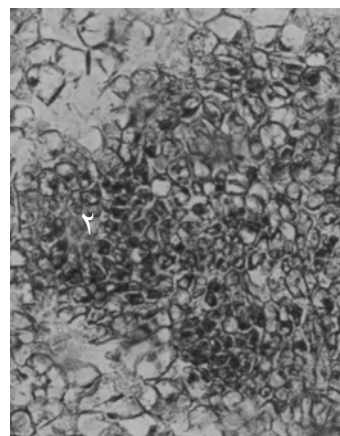
## نتایج

### 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 از کشت، این کالوس‌ها از لحاظ رنگ ظاهری و قدرت نوپیدی 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 در مراحل ابتدایی شکل‌گیری در محیط دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA نشان داد (شکل‌های ۱ و ۲). در محیط‌های کشت با بیش از ۲ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA کالوس‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره بودند و به تدریج از بین رفتند.



شکل ۲- برش میکروسکوپی مربوط به شکل ۱ که یکی از رویان‌ها را در مرحله قلبی شکل نشان می‌دهد

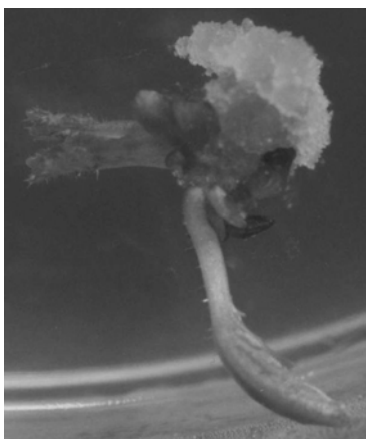


شکل ۱- کالوس ایجاد شده از جداکشت‌های محور زیر لپه در محیط MS دارای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و ۲ میلی‌گرم در لیتر BA

### تشکیل ساقه

همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد سه نوع کالوس بر اساس رنگ و توان نوپیدی در محیط‌های کشت تشکیل شدند. تأثیر نوع کالوس‌ها (سفید و زرد) و محیط‌های کشت بر روی واکنش‌های ریخت‌زایی کاملاً 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 لیتر BA و نیز ۲ میلی‌گرم در لیتر BA تشکیل شدند به مقدار خیلی زیادی ساقه‌زایی کردند (شکل‌های ۳ و ۴) در طی دومین واکنش بر سطح این کالوس‌ها توده‌های روشن و کوچکی پدیدار شدند که با

تکثیر و نمو بیش‌تر به ساقه تبدیل شدند. میانگین تعداد ساقه‌ها در هر جداگشت در محیط دارای ۲ میلی گرم در لیتر BA بیش‌ترین مقدار بود. ( $89 \pm 0/27$  درصد).



شکل ۴- ساقه‌های ایجاد شده در محیط MS دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA



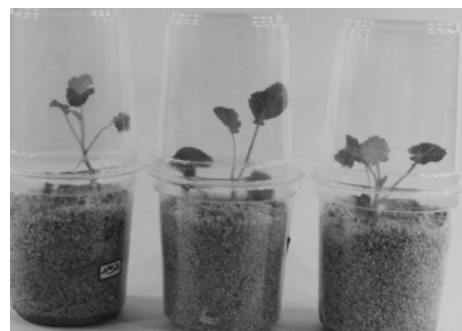
شکل ۳- ساقه ایجاد شده در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA و ۱ میلی‌گرم در لیتر BA

#### ریشه‌زایی و نوپیدی گیاه

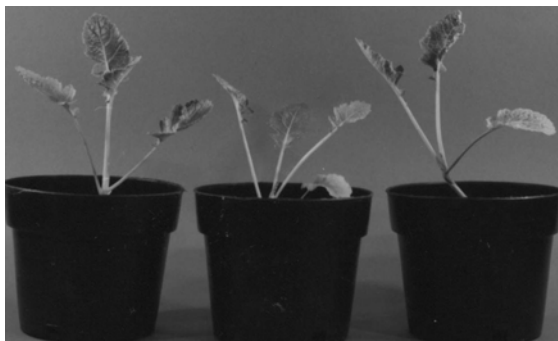
ساقه‌های نو پدید به محیط‌های کشت MS دارای NAA و IBA و نیز محیط پایه بدون هورمون برای ریشه‌زایی واکشت شدند. فقط در محیط کشت دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA ریشه‌زایی مشاهده شد. در این محیط کشت طی حدود ۲ روز (کم‌تر از سایر محیط‌ها) ریشه‌های نوپدید با بیش‌ترین مقدار (۹۰ درصد) تشکیل شدند. دو هفته بعد از انتقال 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 ۵ و ۶ و ۷).



شکل ۵- ریشه‌زایی در محیط MS دارای ۱ میلی‌گرم در لیتر IBA به تنهایی و تشکیل گیاهچه‌های کامل



شکل ۶- گیاهچه‌های شکل ۵ در مرحله سازش



شکل ۷- گیاهچه‌های شکل ۶ در مرحله گلدانی شدن

### بحث

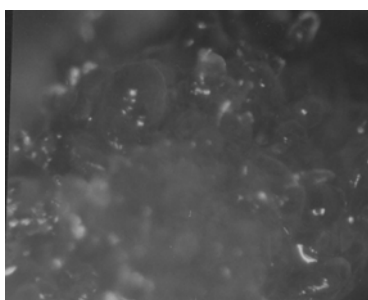
نتایج به دست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که حضور 2,4-D در محیط‌های کشت سبب ایجاد کالوس‌های زرد رنگ می‌شود. گزارش‌های فراوانی بر پایه مشاهدات مسکروسکوپی و توان نو پیدی وجود دارند که نشان از رویان‌زا بودن این نوع از کالوس‌ها دارند [۲]، [۴]، [۵]، [۸]، [۹]، [۱۰]، [۱۱]، [۱۴]. رویان‌زایی پیکری شامل مراحل متعددی است که اولین مرحله آن چنین است:

آغاز کشت‌های رویان‌زا، با کشت جداگشت‌های اولیه بر روی محیط‌های کشت تکمیل شده با مواد تنظیم کننده رشد گیاهی مخصوصاً اکسین‌ها و در برخی موارد سیتوکینین‌ها [۱۵]. در آزمایش‌های ما نیز کالوس‌های زرد رنگ هیچ‌گونه نشان ویژگی‌های ریخت‌زایی حتی پس از ۵ ماه استقرار در محیط کشت نشان ندادند (ساقه‌ها و ریشه‌های نوپدید ایجاد نکردند). ولی بررسی‌های میکروسکوپی حضور ساختارهای رویانی را در آن‌ها به اثبات 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 لیتر BA 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 ۵ تا ۱۰ میکرو مولار بنزیل آدنین (BA) ساقه‌های نوپدید ایجاد کردند. همچنین رودراسمی<sup>۱</sup> و همکارانشان در سال ۱۹۹۸ ثابت کردند که تعداد ساقه‌های نوپدید ایجاد شده در محیط‌های کشت بافت برنج بستگی مستقیمی با مقدار این هورمون در محیط کشت دارد.

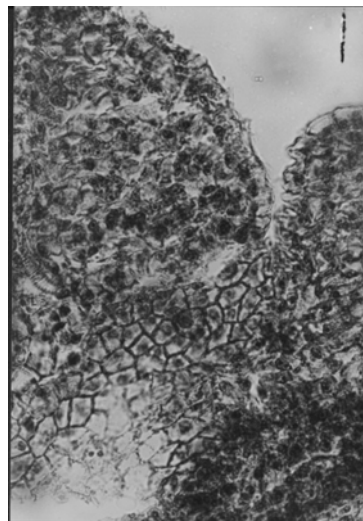
بر سطح کالوس‌های سفید رنگ ایجاد شده در محیط کشت دارای ۲ میلی‌گرم در لیتر BA برجستگی‌های انگشت مانند‌ی ظاهر می‌شدند که با بررسی‌های اولیه کاملاً شبیه رویان‌های پیکری بودند (شکل ۸). برش‌های میکروسکوپی تهیه شده از این برجستگی‌ها وجود مریستم‌های رویشی را در آن‌ها ثابت کرد. بنا بر این می‌توان

<sup>۱</sup>-V. Rudraswamy

نتیجه گرفت که مراحل ایجاد مریستم‌های رویشی و ساقه‌های نوپدید به شکل کامل و یا بخشی از این مراحل در محیط‌های کشت حالتی شبیه به رویان‌زایی پیکری را طی می‌کنند (شکل ۹). این نتایج با گزارش‌های جی.پی.لیو<sup>۱</sup> و همکارانش هم‌سوایی دارد.



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



شکل ۹- برش میکروسکوپی از یکی از این برجستگی‌ها

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

| واکنش ساقه زایی بر حسب تعداد ساقه‌های ایجاد شده در هر جداگشت | ۴،۲-دی کلرو فنوکسی استیک اسید | بنزیل‌آدنن | ایندول بوتیریک اسید |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------|---------------------|
| 0 <sup>e</sup>                                               | 0                             | 1          | 0.7                 |
| 0.56±0.16 <sup>b</sup>                                       | 0                             | 1          | 1                   |
| 0.58±0.019 <sup>e</sup>                                      | 0                             | 1          | 2                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 0                             | 1          | 3                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 0                             | 1          | 5                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 2                             | 1          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 3                             | 3          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 4                             | 4          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 5                             | 5          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 6                             | 6          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 7                             | 7          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 8                             | 8          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 9                             | 9          | 0                   |
| 0 <sup>e</sup>                                               | 10                            | 10         | 0                   |
| 0.89±0.27 <sup>a</sup>                                       | 0                             | 0          | 0                   |

<sup>۱</sup>-J. P. Luo

هر آزمایش سه مرتبه تکرار شده و در مجموع برای هر تیمار ۲۰ تکرار استفاده شده است. همان طور که ملاحظه می شود بین تیمارهای ۲، ۳ و ۱۵ (که واکنش ساقهای در آن ها مشاهده شد) اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد خطا مشاهده می شود.

## 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 (۲۰۰۰).
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 (Fcu lte des Sciences de Paris) et M.Martoja – Pierson (CN R S ), Ψ ° (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.